

SOMATOSTATIN UND VASOAKTIVES

INTESTINALES POLYPEPTID

**Im Gehirn von Ratte und Mensch und im Liquor cerebro-
spinalis von Patienten mit degenerativen Erkrankungen des
Zentralnervensystems: Immunhistochemische und
radioimmunologische Untersuchung**

JÜRGEN UNGER

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0058

Aus der Anatomischen Anstalt
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. W. Lange

SOMATOSTATIN und VASOAKTIVES INTESTINALES POLYPEPTID
im Gehirn von Ratte und Mensch und im Liquor cerebro-
spinalis von Patienten mit degenerativen Erkrankungen
des Zentralnervensystems: Immunhistochemische und
radioimmunologische Untersuchung

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von
Jürgen Unger
aus
Lindau/Bodensee
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Lange

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. ten Bruggencate

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 4. 1986

12. 1. 1911

Mein lieber Vater

Ich habe heute wieder

einige Zeilen für Sie geschrieben, die ich Ihnen

hiermit übersende, wie Sie es wünschen.

Ich hoffe, Sie werden

ihnen gefallen, und ich werde Sie

vielleicht bald wieder

sehen, wenn ich nach Berlin zurückgehe.

Ich habe heute auch noch einige Zeilen für Sie

geschrieben, die ich Ihnen hiermit übersende.

Ich hoffe, Sie werden

ihnen gefallen, und ich werde Sie

vielleicht bald wieder

sehen, wenn ich nach Berlin zurückgehe.

Ich habe heute auch noch einige Zeilen für Sie

Mein lieber Vater

Ich habe heute wieder

einige Zeilen für Sie geschrieben, die ich Ihnen

hiermit übersende, wie Sie es wünschen.

Ich hoffe, Sie werden

ihnen gefallen, und ich werde Sie

vielleicht bald wieder

sehen, wenn ich nach Berlin zurückgehe.

Meinen Eltern und Freunden

I N H A L T

	Seite
Einführung	1
Material und Methoden	15
1. Produktion von Antiseren gegen Peptidhormine	15
2. Charakterisierung der Antiseren	16
3. Radioimmunoassay	23
a) Entwicklung eines Radioimmunoassay für Somatostatin	23
b) Entwicklung eines Radioimmunoassay für Vasoaktives Intestinales Polypeptid	30
4. Herstellung von Extrakten aus Hirngewebe zur quantitativen Bestimmung von Peptiden im Radioimmunoassay	35
5. Immunhistochemische Methode für lichtmikroskopische Untersuchungen	37
6. Bestimmung der Konzentrationen von Somatostatin und VIP im Liquor cerebrospinalis bei Patienten mit Erkrankungen des Zentralnervensystems	40
Ergebnisse	42
1. Somatostatin-Radioimmunoassay	42
Quantitative Verteilung von ST-Immunreaktivität im Rattengehirn	42
Radioimmunologische Bestimmung von ST im menschlichen Gehirn	43
2. Immunhistochemische Darstellung von Somatostatin im ZNS des Menschen	45

	Seite
3. VIP-Radioimmunoassay	62
Bestimmung von VIP-Immunreaktivität im menschlichen Hirngewebe	62
4. Immunhistochemische Darstellung von VIP im Gehirn der Ratte	64
5. Bestimmung der Peptide Somatostatin und VIP im Liquor cerebrospinalis von Kontrollpersonen und Patienten mit Erkrankungen des Zentral- nervensystems	69
6. ST- und VIP-Konzentrationen in Hirnarealen eines Patienten mit Morbus Parkinson: Vergleich mit Kontrollpersonen	76
Diskussion	78
Zusammenfassung	86
Literaturverzeichnis	87
Anhang	104
Danksagung	106
Lebenslauf	107

Einführung

Noch vor etwa 15 Jahren war die Zahl der als zentrale Neurotransmitter bekannten Stoffe beschränkt auf einige Aminosäuren, Katecholamine, Indolalkylamine und ein Peptid, Substanz P. Seither hat sich das Spektrum der Substanzen, die bei der neuronalen Impulsübermittlung eine Rolle spielen, ständig erweitert, da neuere, biologisch aktive Peptide aus dem Zentralnervensystem (ZNS) isoliert wurden. Man kennt inzwischen mehr als 30 Neuropeptide, von denen man annimmt, daß sie neben ihrer Wirksamkeit bei endokrinen Prozessen auch an neuronalen Synapsen aktiv sind. Größtenteils kommen diese Peptide sowohl im ZNS als auch im Gastrointestinaltrakt und weitverbreitet in anderen Geweben vor. Ursprünglich hielt man "hypothalamische Hormone" (d.h. releasing und release-inhibiting hormones) nicht für traditionelle Neurotransmitter. Es war lediglich bekannt, daß diese Peptide von Nervenendigungen an die Portalgefäße abgegeben werden, um auf diesem Weg eine neuroendokrine Wirkung auf die Zellen des Hypophysenvorder- und Zwischenlappens auszuüben. Die klassische Definition eines Neurotransmitters beinhaltet, daß der Stoff in Nervenzellen synthetisiert wird, darin gespeichert und von ihnen freigesetzt wird, wobei der Transmitter im synaptischen Spalt einen spezifischen Effekt auf "Target-Zellen" ausübt. Derselbe Effekt muß auch bei externer Applikation des Stoffes zu erzielen sein. Schließlich ist für einen Neurotransmitter zu fordern, daß er nur kurzzeitig wirkt, also rasch metabolisiert wird oder in die Nervenendigung rückresorbiert wird (Phillis, 1966). Diese Bedingungen scheinen für Neuropeptide zum großen Teil ebenso zu gelten. Ihre Anwesenheit in Neuronen des ZNS ist nachgewiesen und viele Peptide kommen in extrahypothalamischen Regionen vor, so daß eine alleinige Wirkung auf die Hypophyse unwahrscheinlich ist. Studien über ihre Biosynthese ergaben, daß Peptide aus Präkursoren (sog. Prä-Prohormone) in mehreren Schritten durch proteolytische Spaltung entstehen (Shields et al., 1981), anschließend in Vesikeln gespeichert werden und in die neuronalen Fortsätze durch axoplasmatischen Transport gelangen (Rasool et al., 1981). Eine Frei-

setzung an Synapsen ist für verschiedene Peptide, z.B. Luteinizing Releasing Hormone (LRH) und Thyreotropin Releasing Hormone (TRH) in hypothalamischem Gewebe nachgewiesen worden (Bennett et al., 1974) und es bestehen kaum Zweifel, daß die Neuropeptide aus allen Nerven terminalen, in denen sie vorkommen freigesetzt werden können. Zur Inaktivierung stehen in den meisten Hirnregionen Peptidasen zur Verfügung (Marks, 1976), die für einen enzymatischen Abbau verantwortlich sind. Eine Aufnahme in die Zellen, aus denen sie freigesetzt wurden, oder in andere, dem synaptischen Spalt benachbarte Zellen, spielt nach bisherigen Erkenntnissen offenbar keine Rolle. Elektrophysiologische Untersuchungen von Renaud und Padjen (1978) unterstützen die Annahme, daß Peptide die neuronale Aktivität selektiv modifizieren, wenngleich ein abschließendes Ergebnis, ob Peptide tatsächlich Transmitter im eigentlichen Sinn sind, oder als "Neuromodulatoren" mit besonderem Wirkungsmechanismus tätig sind, noch nicht gesichert ist. Neuromodulatoren werden von Hökfelt (1984) als Substanzen definiert, die die Wirkung von anderen Transmittern beeinflussen, indem sie beispielsweise deren Wirkdauer verlängern. Einige Neurone enthalten, außer einem klassischen Transmitter noch zusätzlich ein Peptid, beispielsweise besteht eine Koexistenz zwischen GABA und Somatostatin im Nucleus reticularis thalami der Katze (Oertel et al., 1983), sowie von 5-Hydroxytryptamin (Serotonin), Substanz P und TRH in Nervenendigungen in den Raphekernen (Hökfelt et al., 1978). Es gibt verschiedene Vorstellungen über die Bedeutung der Koexistenz von Peptiden und Transmittern in einer Nervenendigung (Bouton). Die Freisetzung des Peptids könnte einerseits die Rezeptorempfindlichkeit für den aminergen Transmitter regulieren (Fuxe et al., 1984); andererseits wird angenommen, daß Peptide in der Regulation von längerdauernden Nervenimpulsen eine Rolle spielen, z.B. bei trophischen Wirkungen der Nerven (Hökfelt, 1984), oder daß sie bei der Potenzierung von mehreren aufeinanderfolgenden Impulsen mitwirken (Bliss und Lomo, 1973). Darüberhinaus wird eine Wirkung der Peptide bei der Stabilisierung der synaptischen Erregungsübertragung diskutiert (Stent, 1973). Zu einem besseren Verständnis der zentral wirkenden Peptide sind neben ihrer Isolierung und biochemischen Analyse auch elektrophy-

siologische und pharmakologische Studien zur Erforschung der Funktion, sowie immunhistochemische und radioimmunologische Untersuchungen zum Nachweis der Gewebsverteilung und zur Mengenbestimmung im Gewebe und in Körperflüssigkeiten notwendig. Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit den Peptiden Somatostatin (ST) und Vasoaktivem Intestinalem Polypeptid (VIP). Es soll die Verteilung dieser Peptide im Zentralnervensystem des Menschen mit immunhistochemischen und radioimmunologischen Methoden dargestellt werden. Beide Peptide scheinen eine Rolle bei der Impulsübertragung im ZNS zu spielen, so daß insbesondere auch der Frage nachgegangen werden soll, ob diesen Peptiden bei bestimmten Erkrankungen des Zentralnervensystems, insbesondere bei Systemdegenerationen, ähnlich wie bekannten Neurotransmittern eine pathophysiologische Bedeutung zukommt. Als Beitrag zu dieser Fragestellung wird über Befunde berichtet, die bei der quantitativen Messung von ST und VIP im Liquor cerebrospinalis bei Patienten mit verschiedenen neurologischen Krankheitsbildern erhoben wurden.

Somatostatin

Somatostatin (ST) wurde 1972 von Brazeau et al. bei der erfolglosen Suche nach Wachstumshormon Releasing Faktor in Hypothalamus-extrakten entdeckt, isoliert und analysiert. Zuvor schon berichteten Krulich et al. (1968) von einer Substanz im Rattenhypothalamus, die die Freisetzung von Wachstumshormon hemmt. Dies führte zur Hypothese, daß zwei verschiedene, interagierende neurohumorale Faktoren - ein stimulierender und ein hemmender Faktor - bei der Sekretion von Wachstumshormon aus der Hypophyse beteiligt sind. Etwa zur selben Zeit fanden Hellman und Lernmark (1969) in Extrakten von Tauben-Pankreasinseln einen Stoff, der in vitro die Insulinsekretion aus Inselzellen hemmt. Diese beiden, auf den ersten Blick zusammenhangslosen Befunde konnten nach Isolierung und Analysierung dieses Faktors einem einzigen Peptid, dem Somatostatin (Growth-Hormone Release Inhibiting Hormone, GHRH) zugeschrieben werden. Seither kennt man eine Familie von verwandten

Peptiden, die neben den ursprünglich identifizierten Peptid aus 14 Aminosäuren (Tetradecapeptid, genannt ST-14), ein am N-Terminal verlängertes Peptid aus 28 Aminosäuren (ST-28), verschiedene speziel-spezifische Varianten und größere Prohormone (Präkursoren) einschließt. Es scheint nunmehr die ursprüngliche Bezeichnung "Somatostatin" nicht mehr genügend kennzeichnend zu sein, da das Peptid weitverbreitet in Zellen vorkommt, die nichts mit der Wachstumshormonsekretion zu tun haben, z.B. besteht eine ausgedehnte Verbreitung im ZNS der Ratte (Brownstein et al., 1975) und anderen Mammaliern (Triepele et al., 1984), sowie in vielen Geweben außerhalb des Gehirns, wie etwa im Gastrointestinaltrakt und in exokrinen und endokrinen Drüsen (Polak et al., 1975; Larsson, 1980; Girod et al., 1980; Molnar et al., 1976 und Yamada et al., 1977). Das Vorkommen von ST ist außer bei Mammaliern in einer Vielzahl von Organismen beobachtet worden, so in allen Vertebratenklassen und bei vielen Nichtvertebraten (Vale et al., 1976; Jackson, 1978; Bläher et al., 1982), sogar in Protozoen (Berelowitz et al., 1982). Dies bedeutet, daß die verantwortlichen Gene bereits am Anfang der Evolution entwickelt wurden, noch bevor differenzierte Kommunikation zwischen Zellen, bzw. Nerven und Zellen bestanden (Roth et al., 1982). Die Tatsache, daß die molekulare Struktur, d.h. der Phänotyp von Somatostatin-14 über die gesamte Zeit der Evolution (mindestens 400 Millionen Jahre) bewahrt wurde, weist darauf hin, daß die spezifische Konfiguration von ST-14 einen Selektionsvorteil für die entsprechend damit ausgestatteten Organismen bedeutet.

Biosynthese und Transport

Durch genetische Rekombinationstechnik ist es gelungen, die vollständige Sequenz der Vorstufe, d.h. des Prä-Prohormones zu ermitteln (Hobart et al., 1980; Warren et al., 1982; Shen et al., 1982). Das Prä-Prosomatostatin wird wie alle Proteine im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und anschließend zum Golgi-Apparat transloziert, wo es durch Abspaltung einer Aminosäuresequenz zur Freisetzung des Prohormons kommt (Shields et al.,

1981). Das Prohormon wird durch weitere Proteolyse verändert, sog. "processing", und bildet ST-14 und ST-28 (Zingg und Patel, 1982). Der Vorgang des "processing" unterliegt wahrscheinlich der zellulären Kontrolle, da das Verhältnis von ST-14 zu ST-28 zell- und organspezifisch festgelegt ist (Rorstad et al., 1979). Dies mag auch eine wichtige Rolle für die Funktion spielen, da sich die beiden Somatostatinmoleküle hinsichtlich ihrer biologischen Effekte zum Teil stark unterscheiden. So ist ST-28 ein weitaus stärkerer Hemmstoff der Insulinsekretion als ST-14 (Mandarino et al., 1981) und ein stärkerer "Neuromodulator" als ST-14 (Brown et al., 1981). Im Gegensatz zu ST-14 hat ST-28 aber keinen Einfluß auf die Durchblutung des Dünndarms, die Sauerstoffaufnahme intestinaler Zellen und die intestinale Motilität (Konturek et al., 1981).

Funktion

a. Hypothalamo-hypophysäre Regulation

Wie aus dem Namen schon abzuleiten ist, beteiligt sich Somatostatin an der Regulierung der Wachstumshormonsekretion, wobei es einen inhibitorischen Einfluß ausübt (Martin et al., 1978). Dies konnte durch verschiedene Untersuchungen nachgewiesen werden, bei denen durch Unterdrückung des ST-Einflusses eine Erhöhung der Plasma-Wachstumshormon-Konzentration erreicht werden konnte (Terry und Martin, 1981; Arimura et al., 1976). Umgekehrt konnte gezeigt werden, daß durch ST-Applikation der stimulierende Effekt von Wachstumshormon-Releasing-Hormon auf den Hypophysenvorderlappen aufgehoben wird (Wehrenberg et al., 1982). Bei Erhöhung der Plasma- oder Liquor-Somatotropin-Konzentration, z.B. durch Wachstumshormoninfusionen, wird die hypophysäre Sekretion von STH aufgrund eines feed-back Regelkreises unterdrückt (Tannenbaum, 1980; Abe et al., 1983) und die Freisetzung von Somatostatin in das Portalblut erhöht (Sheppard et al., 1978; Berelowitz et al., 1981; Chihara et al., 1981). Vale et al. (1974) zeigten, daß ST in vitro die Freisetzung von Thyreotropin (TSH) aus Hypophysenzellkulturen hemmt. Darüberhinaus werden durch ST die basalen

TSH-Spiegel in der Ratte (Chihara et al., 1978) und beim Menschen (Weeke et al., 1975) gesenkt. Diese Befunde weisen darauf hin, daß die TSH-Sekretion der Adenohypophyse außer durch TRH und Schilddrüsenhormone noch zusätzlich durch Somatostatin reguliert wird. Neben den erwähnten Wirkungen auf die Wachstumshormon- und TSH-Freisetzung der Hypophyse finden sich in der Literatur Berichte über hemmende Einflüsse von ST auf die Prolaktinsekretion in Zellkulturen (Vale et al., 1974), jedoch nicht bei Normalpersonen (Hall et al., 1973; Siler et al., 1973). Möglicherweise läßt sich die Suppression nur mit sehr hohen Dosen ST über einen längeren Zeitraum erzielen. Bezüglich weiterer Vorderlappenhormone findet sich keine Beeinflussung durch ST bei den Hormonen LH und FSH (Höffken und Lucke, 1975), sowie in der Sekretion von ACTH beim Gesunden (Hall et al., 1973). Dagegen berichten Tyrell et al. (1975) über eine Suppression der ACTH-Hypersekretion beim Nelson-Syndrom (ACTH-Zelltumor) nach ST-Gabe, und Fehm et al. (1976) beschreiben ST als potenten Inhibitor der vermehrten ACTH-Ausschüttung bei Nebennierenrindeninsuffizienz.

b. Wirkung auf gastrointestinale Hormone und auf die Pankreasfunktion

Somatostatin übt verschiedene physiologische Effekte auf den Magen-Darm-Trakt aus; es hemmt die Magenentleerung, die Kontraktion der Gallenblase und die Motilität des Dünndarmes. Außerdem senkt ST-14 den mesenteralen Blutfluß und erhöht den Gefäßwiderstand. Die Absorption vieler Nahrungsstoffe (Glucose, Galaktose, Fructose, Aminosäuren, Triglyceride, Calcium und Wasser) wird durch ST verringert. Schusdziarra et al. (1979) nehmen an, daß ST eine wichtige physiologische Bedeutung bei der Regulation der Absorptionsrate aufgenommener Nahrungsmittel in das Blut besitzt. Darüberhinaus hemmt Somatostatin die exokrine Sekretion von Magensäure und Intrinsic Factor, sowie die Zellproliferation der Mucosa des Magens. Im Pankreas wird die Bicarbonat- und Enzymsekretion verringert. Viele dieser Beobachtungen lassen sich durch inhibitorische Wirkungen von ST auf die Sekretion anderer gastro-intestinaler Hormone erklären. ST wirkt hemmend auf Gastrin, Se-

kretin, VIP, Glucagon, Insulin, Motilin, gastric inhibitory peptide (GIP), pancreatic polypeptide (PP) und Cholezystokinin (Bloom et al., 1974; Raptis et al., 1975; Efendic et al., 1975; Johnson et al., 1975; Alberti et al., 1973; Creutzfeld et al., 1975 und Gerich, 1981).

c. Verteilung und Funktion im Nervensystem

Mehrere Studien der letzten Jahre haben die weite Verbreitung von Somatostatin im ZNS mit immunhistochemischen und radioimmunologischen Verfahren gezeigt. Somatostatin-immunreaktive (ST-IR) Zellen und Fasern werden in besonderem Maße im Hypothalamus gefunden, wo, besonders aus der vorderen periventriculären Region Fasern zur Eminentia mediana ziehen, dem Ursprungsort der hypothysären Portalgefäße, die zum Lobus anterior der Hypophyse führen (Alpert et al., 1976; Patel und Reichlin, 1978). Außerhalb des Hypothalamus findet man ST in Basalganglien, insbesondere im ventromedialen Striatum (Beal und Martin, 1983), im Thalamus, im Corpus amygdaloideum, in der Stria terminalis, sowie im Cortex, im Hirnstamm, in der Medulla oblongata und im Rückenmark, besonders in der Hinterwurzel bei verschiedenen Mammaliern, z.B. Ratte und Tupaia (Forssmann et al., 1978; Forssmann et al., 1979; Epelbaum et al., 1979; Brownstein et al., 1975 und Krisch, 1981). Im peripheren Nervensystem wurde von Hökfelt et al. (1977 und 1980) ST-Immunreaktivität in sensorischen Neuronen der Spinalganglien, sowie in peripheren sympathischen Neuronen demonstriert, wobei letztere demnach eine Koexistenz von ST mit Katecholaminen aufweisen. Im parasympathischen Teil des Nervensystems ist ST im Vagus gefunden worden (Lundberg et al., 1978). Darüberhinaus gibt es ST-IR Zellen in einer Vielzahl weiterer Systeme, so etwa in sensorischen Zellen der visuellen Bahn, einschließlich der Retina, des Nervus opticus und des Tectum mesencephali (Rohrstad et al., 1979; Yamada et al., 1980).

Um Einblick in die Funktion dieses Peptides zu erhalten, wurde in elektrophysiologischen Experimenten ST durch Mikroiontophorese in verschiedene Hirnregionen appliziert. Renaud und Padjen (1978)

fanden elektrophysiologisch einen hemmenden Einfluß von ST auf einen Teil der Neurone des Cortex cerebri, des Cortex cerebelli und des Hypothalamus der Ratte. Randic und Miletic (1978) fanden eine ähnliche Herabsetzung der Exzitabilität in nozizeptiven Neuronen des Rückenmarks der Katze. Andere Befunde in der Literatur sprechen dagegen von einer exzitatorischen Aktivität von ST nach iontophoretischer Applikation im Cortex cerebri (Renaud und Padjen, 1978) bzw. in Zellkulturen corticaler Neurone (Dichter und Delfs, 1981). Aus synaptischen Terminalen wird Somatostatin mittels eines calciumabhängigen Mechanismus freigesetzt (Berelowitz et al., 1981; Bakhit et al., 1983), so daß anzunehmen ist, daß die Freisetzung über die Membran auf dieselbe Art kontrolliert wird, wie dies bei anderen Neurotransmittern geschieht. Nach Freisetzung könnte ST an spezifische Rezeptoren binden, die beispielsweise im Striatum nachgewiesen sind (Reubi et al., 1981; Srikanth und Patel, 1981). Desweiteren gibt es Hinweise, daß eine Interaktion zwischen anderen Neurotransmittern und Somatostatin besteht, z.B. hemmt Acetylcholin die Freisetzung von ST aus Rattenhypothalamus in vitro (Richardson et al., 1980). Chesselet (1983) berichtet nach ST-Applikation über eine dosisabhängige Erhöhung der Dopaminsekretion im Striatum der Ratte, sowie im Nucleus caudatus der Katze.

Letztlich ist eine schlüssige Aufklärung der Rolle dieses Neuropeptides im ZNS noch nicht gelungen; viele widersprüchliche Befunde wurden erhoben und einzelne Funktionen konnten fragmentarisch dargestellt werden, doch liegt die genaue physiologische Bedeutung noch im Bereich des Spekulativen.

Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP)

Von Said und Mutt wurde 1970 aus Dünndarmextrakten des Schweines ein neues Polypeptid isoliert. Die erste biologische Charakterisierung erbrachte, daß das Peptid ein starker peripherer Vasodilatator ist, besonders im Mesenterialbereich (Said und Mutt, 1970). Diese Beobachtung führte zur Benennung dieses Peptids als "vasoactive intestinal polypeptide" (VIP). Die Aminosäuresequenz wurde ebenfalls von Mutt und Said (1974) aufgeklärt und durch Synthese des Peptids bestätigt (Bodanszky et al., 1974). VIP des Schweines ist ein basisches, lineares Polypeptid aus 28 Aminosäuren (Octacosapeptid). Von Nilsson (1974) konnte VIP aus dem Dünndarm des Huhnes isoliert werden. Dieses unterscheidet sich von VIP des Schweines lediglich in vier Aminosäuren (Nilsson, 1974). Die Primärstruktur von VIP ist in Teilsequenzen ähnlich der von Sekretin, Glucagon und gastric inhibitory peptide (GIP). Daher wurden diese vier Peptide zur Gruppe II der Klassifikation nach Pearse (1974) zusammengefaßt (Abb. 2).

Verteilung und biologische Aktivität

a. Gastrointestinaltrakt

Die höchsten Konzentrationen von VIP-Immunreaktivität wurde mittels Radioimmunoassay im Dünndarm gefunden, wobei sowohl in der Mucosa als auch in der Submucosa VIP zu gleichen Anteilen vorhanden ist (Bryant et al., 1976). Immunhistochemisch wurde VIP in zahlreichen Nervenfasern in allen Schichten der Darmwand und im Pankreas dargestellt (Larsson et al., 1976). Sowohl im Gastrointestinaltrakt, als auch in der Gallenblase und im Pankreas findet man VIPerge Nervenendigungen, die nahe an den kleinen Blutgefäßen, glatten Muskeln und Epithelzellen liegen (Larsson et al., 1976; Sundler et al., 1977 und 1978). Diese Befunde weisen auf eine mögliche Rolle von VIP für die Regulation des Blutflusses in der Mucosa, für die Aktivität der glatten Muskeln und für die epitheliale Zellfunktion hin. In den Plexus myenterici und submucosi ist ein Netzwerk aus VIP-immunreaktiven Fasern und VIP-IR

Nervenzellperikaryen gefunden worden, was zum Postulat eines "intrinsic VIPergen Nervenplexus" im Gastrointestinaltrakt führte, da außer dem Nachweis von VIP-immunreaktiven Nervenzellen weder eine Vagotomie noch eine Sympathektomie zu einer Reduzierung der VIPergen Fasern führte (Larsson et al., 1978). Während die eben dargelegte Lokalisationsbeschreibung von VIP in Neuronen des Verdauungstraktes allgemein akzeptiert ist, gibt es widersprüchliche Berichte in der Literatur über die Anwesenheit von VIP in endokrinen bzw. parakrinen Zellen. Polak et al. (1974) geben an, daß VIP-Immunreaktivität in endokrinen Zellen in allen Teilen des Verdauungstraktes vorkommt. Ebenso zeigen immunhistologische Studien von Buffa et al. (1977) die Darstellung von VIP-Immunreaktivität in endokrinen Zellen des Pankreas und des Darmes. Im Gegensatz hierzu war mit Antiseren der Arbeitsgruppe um Fahrenkrug und Schaffalitzky de Muckadell (1977) die Darstellung von VIP-Immunreaktivität in endokrinen Drüsen nicht möglich. Ähnlich negative Befunde werden von Gaginella et al. (1978) berichtet, die in isolierten Epithelzellen weniger als ein Prozent des Gesamt-VIP-Gehaltes des Dünndarmes fanden. Eine Erklärung für diese Diskrepanz in den Befunden könnte nach Ansicht von Fahrenkrug (1979) darin liegen, daß sich die verwendeten Antiseren in ihren Kreuzreaktionen mit anderen immunreaktiven Formen von VIP oder weiteren Peptiden, die in endokrinen Zellen vorkommen, unterscheiden.

Über die Funktion von VIP im Gastrointestinaltrakt liegen einige Studien vor. VIP hat die Fähigkeit, die Muskeln des Magens in vitro (Piper et al., 1970; Said und Faloona, 1975) und in vivo (Fahrenkrug et al., 1978) zu relaxieren und könnte auf diese Weise zur Erschlaffung des Magens bei Nahrungsaufnahme (sog. rezep-tive Relaxation) - neben einem vagalen Reflex - beitragen (Fahrenkrug, 1979). Weiterhin gibt es Hinweise, daß VIP einen Einfluß auf die Regulation der Durchblutung des Dün- und Dickdarmes hat und nach Nahrungsaufnahme dort zu einer Hyperämie führt (Fahrenkrug, 1978). Für diese Annahme spricht, daß VIP sowohl von Kachelhofer et al. (1974), als auch von Thulin et al. (1973) als potenter Vasodilatator beschrieben wurde. Darüberhinaus findet man im in vivo isoliert perfundierten Pankreas des Schweines

einen sekretin-ähnlichen Einfluß von VIP auf die Wasser- und Bicarbonat-Sekretion. Die Bedeutung von VIP hierfür wurde durch die Beobachtung weiter unterstützt, daß durch eine vagale Stimulation neben der erwarteten Wasser- und Bicarbonat-Freisetzung auch eine erhöhte Abgabe von VIP aus dem Pankreas stattfindet (Lindkaer et al., 1978).

b. VIP im Nervensystem

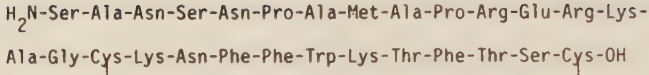
Radioimmunologische und immunhistochemische Studien zeigen die Anwesenheit von Vasoaktivem Intestinalem Polypeptid im zentralen und peripheren Nervensystem. Im ZNS finden sich radioimmunologisch die höchsten Konzentrationen im Cortex cerebri (Bryant et al., 1976; Said und Rosenberg, 1976; Giachetti et al., 1977; Fahrénkrug und Schaffalitzky de Muckadell, 1977). Immunhistochemische Untersuchungen an der Ratte haben diese Befunde bestätigt; VIP-immunreaktive Perikarya und Nervenendigungen wurden hauptsächlich in corticalen Regionen beobachtet (Fuxe et al., 1977; Lorén et al., 1979). Darüberhinaus findet man VIPerge Nervenendigungen in verschiedenen subcorticalen Strukturen, besonders in Kernen der Area praeoptica, im ventromedialen Hypothalamus (Larsson et al., 1976) und in den Amygdalakernen (Fuxe et al., 1977). Außerdem gibt es Berichte über VIP-Immunreaktivität in cerebralen Arterien und in den Plexus choroidei. Histochemisch zeigte sich, daß diese Immunreaktivität in Nervenfasern vorkommt, die an der Grenze zwischen Adventitia und Media der Gefäße verlaufen (Larsson et al., 1976) bzw. im Plexus choroideus den Epithelzellen benachbart verlaufen (Lindvall et al., 1978). Card et al. (1981) beobachteten ferner in einer licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchung VIP-IR Neurone und Fortsätze im Nucleus suprachiasmaticus, der somit neben Vasopressin und Neurophysin (Sofroniew und Weindl, 1978; Weindl und Sofroniew, 1980), sowie Somatostatin (Alpert et al., 1976; Dierickx und Vandesande, 1979) ein weiteres Peptid aufweist. Eine mögliche Funktion von VIP als Neurotransmitter wird von verschiedenen Autoren diskutiert. Dafür spricht, daß VIP in vitro aus hypothalamischem Gewebe spontan freigesetzt

wird. Ein Anstieg der Freisetzung läßt sich in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration durch eine Depolarisation der Nervenmembran mittels Erhöhung der Kaliumkonzentration erreichen (Emson et al., 1978). Aus kortikalen Synapsen läßt sich VIP ebenfalls durch depolarisierende Stimuli freisetzen (Giachetti et al., 1977). Eine biologische Wirkung von VIP könnte über die Aktivierung des Adenylatzyklesystems erfolgen, da sich im Gehirn eine VIP-abhängige Adenylatzykase nachweisen läßt (Deschodt-Lankmann et al., 1977; Quik et al., 1979), wobei allerdings regionale Unterschiede in deren Aktivierbarkeit auftreten sollen. VIP stimuliert die Adenylatzykase in VIP-reichen Regionen, z.B. im Cortex cerebri, im Hypothalamus und Hippocampus, aber auch im Cortex cerebelli, wo VIP praktisch nicht vorkommt. Keine Stimulierbarkeit des Enzyms zeigt sich im Nucleus caudatus und Hirnstamm (Borghi et al., 1979). Diese Beobachtung steht allerdings im Gegensatz zu den Berichten von Kerwin et al. (1980) und Quik et al. (1978), die beide übereinstimmend eine VIP-abhängige Adenylatzykaseaktivität im Nucleus caudatus, sowie das Fehlen einer solchen Aktivität im Cerebellum zeigten. Darüberhinaus gibt es neuerdings Berichte über einen Synergismus zwischen VIP und Noradrenalin in deren Stimulierung eines Anstiegs von zyklischem AMP im Cortex cerebri (Magistretti und Schorderet, 1984). Im Cortex cerebri der Ratte ist eine Koexistenz von VIP und Acetylcholin nachgewiesen (Eckenstein und Baughman, 1984). Diese Beobachtung kann bedeutsam sein für neurodegenerative Erkrankungen, beispielsweise Morbus Alzheimer, bei dem corticale cholinerge Neurone zugrunde gehen. Als weitere Tatsache für eine Neurotransmitterfunktion von VIP spricht, daß das Peptid nach iontophoretischer Applikation eine Exzitation zentraler Neurone verursacht (Phillis et al., 1978). Ebenso ist eine neuroendokrine Funktion möglich, wenn man an die VIPergen Terminalen denkt, die verschiedene hypothalamische Kerne erreichen (Fuxe et al., 1977). Die Beobachtung von VIP-Immunreaktivität in Hirnarterien und die dilatatorische Eigenschaft des Peptids lassen eine Teilnahme an der Regulation der cerebralen Durchblutung wahrscheinlich erscheinen.

Somit sind einige Hinweise für eine Neurotransmitterfunktion von

VIP gegeben und einige Kriterien, die definitionsgemäß hierfür notwendig sind, erfüllt, jedoch steht ein Beweis, wie bei anderen Neuropeptiden auch, noch aus.

Somatostatin-28



Somatostatin-14

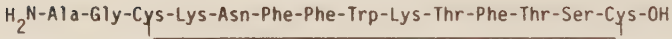


Abb. 1: Aminosäuresequenz von ST-28 und ST-14.

ST-14 ist ein zyklisches Tetradecapeptid, das aus (Pro-) Somatostatin-28 durch Proteolyse entsteht.

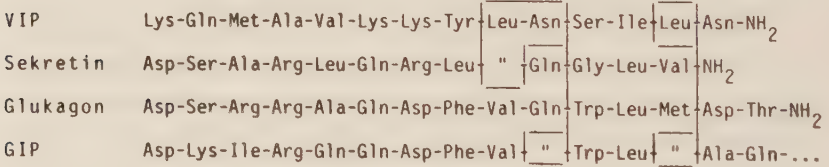
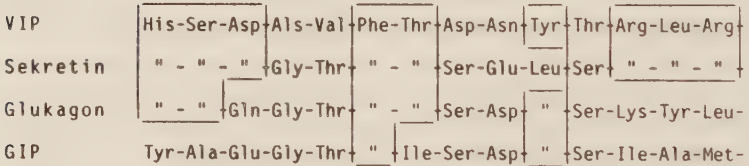


Abb. 2: Aminosäuresequenz von VIP, Sekretin, Glukagon und Teilsequenz von gastric inhibitory peptide (GIP) mit seinen ersten 29 Aminosäuren (Gruppe II der Klassifikation nach Pearse). Die Aminosäuren von Sekretin, Glukagon und GIP, die mit VIP übereinstimmen, sind eingerahmt (nach Kachelhofer et al., 1979).

Material und Methoden

1. Produktion von Antiseren gegen Peptidhormone

Da es sich bei Peptiden um relativ kleinmolekulare Substanzen handelt, sind sie allein nicht in der Lage, das Immunsystem geeigneter Versuchstiere (Kaninchen) zu stimulieren. Daher ist es notwendig, das Hapten (z.B. Somatostatin oder VIP) an ein hochmolekulares Trägermolekül zu konjugieren, um auf diese Weise die Herstellung eines Vollantigens zu erreichen. Wir wählten als Kopplungsprotein Thyroglobulin, da dieses in Schilddrüsenfollikeln "maskiert" vorliegt und normalerweise nicht in die Immuntoleranz des Organismus einbezogen ist, so daß das Abwehrsystem bei Gabe dieses Proteins zusätzlich einen Reiz erhält. Die Peptide werden mit Hilfe von Carbodiimid in einem Verhältnis von 80 : 1 (Peptid : Thyroglobulin) an Thyroglobulin konjugiert (Vaitukaitis et al., 1971; Skowsky und Fischer, 1972; Sofroniew et al., 1978). Das konjugierte Peptid wird dialysiert, anschließend mit Freund's komplettem Adjuvans emulgiert und jeweils ca. 0,2 mg jungen, weiblichen Kaninchen intradermal an multiplen Stellen des Rückens injiziert. Etwa alle zwei Wochen erfolgt eine subcutane oder intramuskuläre Boosterung der Tiere. Nach etwa fünf Boosterungen erfolgt eine Immunisierungspause von ca. zwei Monaten mit anschließender erneuter vier- bis fünfmaliger Boosterung. In der Regel werden mindestens zwei, im Falle von ST wurden vier Kaninchen immunisiert, um eine möglichst hohe Wahrscheinlichkeit zu erreichen, daß unter den produzierten Antiseren auch hochtitrige sind. Etwa fünf Wochen nach Immunisierungsbeginn wird den Kaninchen 15 bis 20 ml Blut aus den Ohrvenen entnommen und das gewonnene Serum auf Immunreaktivität getestet. Bei positivem Ausfall dieses Tests erfolgen weitere Blutabnahmen in 14-tägigem Rhythmus, alternierend zu den Boosterungen.

2. Charakterisierung der Antiseren

Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)

Dieses Verfahren erlaubt den empfindlichen Nachweis von Antikörpern und bei entsprechender Versuchsanordnung auch von Antigenen. Der ELISA beruht auf der Bildung eines "Doppelantikörper-Sandwiches" und wird daher auch als indirekter ELISA bezeichnet. Als Meßreaktion dient eine sensitive enzymatische Farbreaktion, mit deren Hilfe quantitative Aussagen über Titer und Spezifität eines Antiserums möglich sind (Voller et al., 1979).

Prinzip (vgl. Abb. 3)

- 1) Das Antigen (Somatostatin, VIP etc.) wird an die feste Phase (Kunststoffwand) einer Mikrotiterplatte (DYNATECH) adsorbiert. Dazu wird eine Konzentration von 1 - 10 µg/ml des Antigens in 0,1 molarem Carbonatpuffer (pH 9,6; sog. "Coating-Puffer") hergestellt und jeweils 0,2 ml in die Kavitäten der Platte gefüllt und bei 4 °C übernacht inkubiert. Nicht adsorbierter Überschuß des Antigens wird abgewaschen und anschließend die Platte getrocknet. Die auf diese Weise behandelte Mikrotiterplatte ist ca. vier Monate verwendbar.
Eine 1 : 2 - Reihenverdünnung des Antiserums (z.B. 1 : 50 bis 1 : 102400) wird in Phosphatpuffer mit 0,1 % Triton-X 100 (PTB-Puffer, 0,1 M, pH 7,4) hergestellt, auf die Platte pipettiert und bei 4 °C übernacht inkubiert; unspezifisch gebundene Anteile des Serums werden danach durch sorgfältiges Waschen mit 0,1 %iger Triton-X - Lösung entfernt.
- 3) Ein Enzym-gekoppeltes Anti-Spezies-Gammaglobulin (Alkalische Phosphatase konjugiertes Anti-Kaninchen-IgG,) wird zugefügt, ein bis drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut gewaschen.
- 4) Als letzter Schritt erfolgt die Zugabe eines Enzym-Substrates (para-Nitrophenylphosphat, SIGMA), 1 mg/ml in Diäthanolaminpuffer (1-Molar, pH 9,8), das bei Anwesenheit von Alkalischer Phosphatase ein intensiv gelb gefärbtes Produkt entwickelt.

Nach etwa 30 Minuten wird die Extinktion der Farblösung an einem Mikroelisa-Photometer (DYNATECH) bei 405 nm gemessen.

Die Extinktion ist bei konstanten äußeren Bedingungen (Temperatur, Reaktionszeit, Konzentrationen der eingesetzten Reagenzien) nur abhängig von der Menge Enzym, die das Substrat umsetzt und damit wiederum ein Maß für die Menge spezifischer Antikörper im Testserum. Zur Kontrolle wird jeweils ein Non-Immunserum (Präimmunserum desselben Tieres), sowie Puffer als Nullwert unter sonst gleichen Bedingungen mitgetestet.

Titerverlauf (Abb. 5)

Um zu quantitativen Aussagen über den Titer verschiedener Antiseren, bzw. über Antiserum eines Tieres zu verschiedenen Immunisierungszeitpunkten zu gelangen, wählten wir einen internen Standard, d.h. ein positives Antiserum als Referenzserum, mit dem alle übrigen Antiseren verglichen werden. Auf diese einfache Weise erhält man einen exakten Verlauf der Titer. Darüberhinaus besteht die Möglichkeit "Antikörpereinheiten" (AE) anzugeben und die Seren jederzeit hinsichtlich ihrer Güte zu vergleichen. Das Verfahren wurde in Anlehnung an ein von Dr. W. Müller-Esterl, Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie (Abteilungsleiter: Prof. Dr. H. Fritz), zur Bestimmung von Kallikrein ausgearbeitet. Es muß jedoch betont werden, daß es sich um ein Verfahren handelt, bei dem die Seren relativ zueinander verglichen werden, da die Angabe eines Endpunkttiters aufgrund des asymptotischen Kurvenverlaufes (vgl. Abb. 4) nur ungenau möglich ist. Es hat sich aber im Laufe der Anwendung gezeigt, daß der indirekte ELISA der geforderten Aufgabe, Titerverläufe und Kreuzreaktionen auszutesten vollkommen gerecht wird. Bei der Auswertung wird so vorgegangen, daß ein Antiserum, das im ELISA gegenüber Präimmunserum (PIS) eine deutlich meßbare Extinktion zeigt, als Referenzserum definiert wird. 1 µl dieses Serums entspricht dann 1 Antikörpereinheit (1 AE). Alle weiteren Antiseren werden auf diesen willkürlichen Standard bezogen. Bei der Auswertung ist

zu beachten, daß ein Vergleich der Seren nur innerhalb des linearen und parallelen Bereichs der ELISA-Diagramme erlaubt und sinnvoll ist (vgl. Abb. 4).

Spezifitätstest (Kreuzreaktionstest)

Der Versuchsansatz und -ablauf gleicht demjenigen, welcher beim ELISA beschrieben wurde. Statt dem eigentlichen Antigen (z.B. Somatostatin) wird hier eines oder mehrere andere Peptide, gegen die eine mögliche Kreuzreaktion des Antiserums geprüft werden soll, an die Wand der Mikrotiterplatte adsorbiert. Anschließend wird eine Verdünnungsreihe des zu testenden Serums, sowie PIS als Kontrolle pipettiert. Sieht man eine deutliche Extinktion im Vergleich zu PIS, so sind im vorliegenden Serum kreuzreagierende Antikörper enthalten. Im anderen - erwünschten - Fall darf die Extinktion zwischen PIS und Antiserum nicht signifikant voneinander abweichen. Insbesondere in höheren Verdünnungsstufen, bei denen unspezifische Adsorptionsvorgänge kaum eine Rolle spielen (erfahrungsgemäß ab etwa 1 : 400 Verdünnung des Antiserums) darf der Unterschied in den Extinktionen nur innerhalb des Meßfehlerbereichs liegen (Abb. 6).

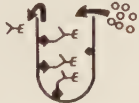
	<u>ELISA</u> = enzyme-linked-immuno-sorbent-assay 1, Inkubation von adsorbiertem Antigen mit Antiserum 1a, Waschen
	2, Inkubation mit enzym-konjugiertem Anti-Spezies-IgG (X-E) 2a, Waschen
	3, Inkubation mit Enzym-Substrat: $\text{X-E} + \text{Substrat/O} \rightarrow \text{Farbstoff / H}$
	4, Photometrische Messung: Intensität entspricht der Konzentration spezifischer Antikörper (X)

Abb. 3: Schematische Darstellung des Prinzips für einen indirekten Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern.

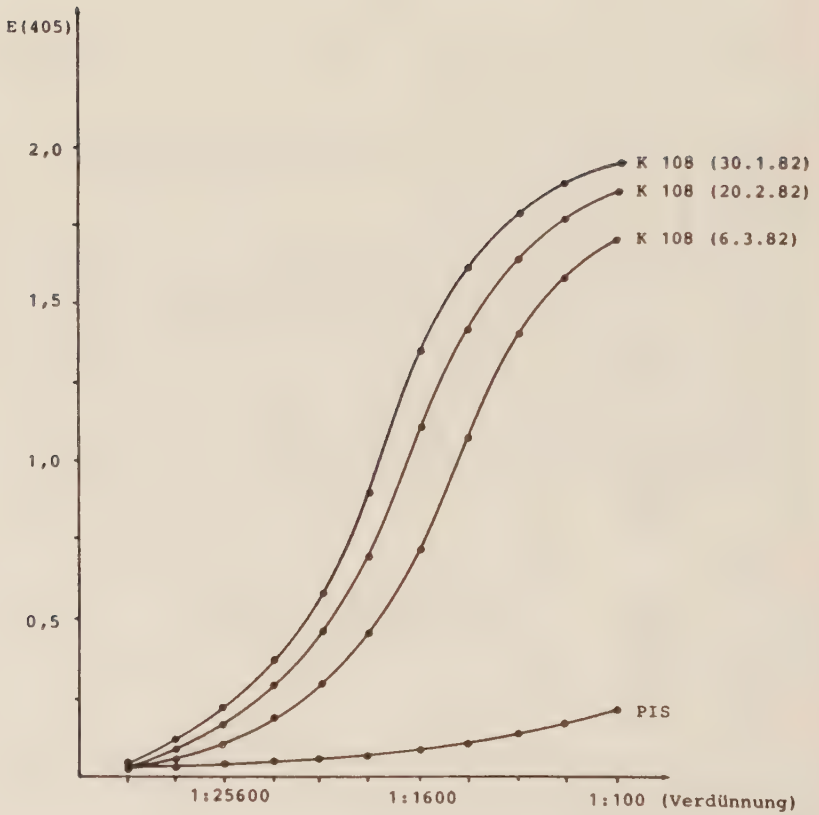


Abb. 4: ELISA-Diagramm zum Titervergleich eines Antiserums zu verschiedenen Immunisierungszeitpunkten. Ein Vergleich ist innerhalb des linearen und parallelen Bereichs der Kurven möglich. PIS = Präimmunserum.

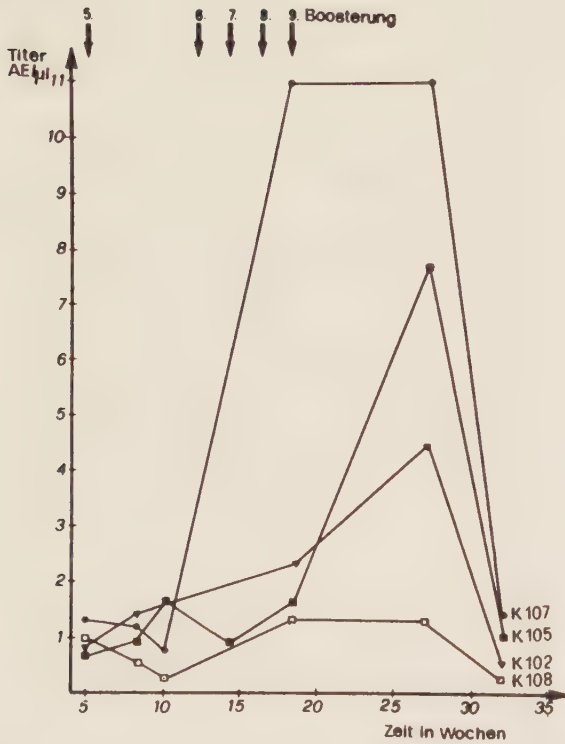


Abb. 5: Vergleich der Antikörpertiter von vier, gegen Somatostatin-14 immunisierten Kaninchen (K 102, K 105, K 107 und K 108). Die Anzahl der Boosterungen ist durch entsprechend bezifferte Pfeile gekennzeichnet. AE = Antikörpereinheit

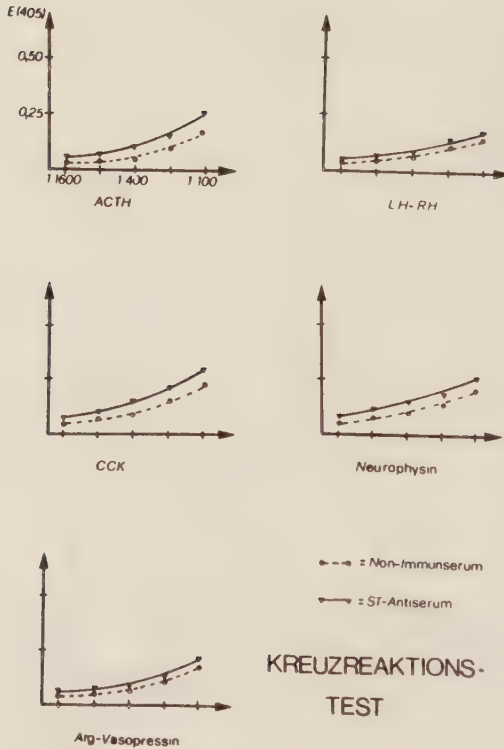


Abb. 6: ELISA zur Erfassung von kreuzreagierenden Antikörpern. Das Somatostatinantiserum K 107 zeigt mit keinem der hier angegebenen Peptide ACTH, LHRH, Cholezystokinin (CCK), Arginin-Vasopressin und Neurophysin eine signifikante Kreuzreaktion.

3. Radioimmunoassay (RIA)

Beim RIA handelt es sich um ein empfindliches Meßverfahren zur Bestimmung von kleinsten Mengen an Substanzen (Peptidhormone im Picogrammbereich), wobei eine radioaktiv markierte Substanz (Tracer) mit bekannten (Standard) oder unbekannten Mengen (Sample) nicht markierter Substanz um die Bindung an eine limitierte Menge spezifischer Antikörper konkurriert. Nach Erstellung einer Standardkurve können unbekannte Konzentrationen abgelesen werden.

a) Entwicklung eines Radioimmunoassay für Somatostatin

Jodierung

Zur radioaktiven Markierung eines Peptides mit Jod-125 (Halbwertszeit: 60 Tage) ist das Vorhandensein der Aminosäure Tyrosin von Wichtigkeit. Natürliches ST besitzt in seiner Aminosäuresequenz kein Tyrosin, so daß ein synthetisches Tyr-ST zur Jodierung verwendet wird. Die Antigenität dieses Peptids wurde im ELISA mit nichttyrosiniertem ST verglichen (s. Abb. 7). Die Darstellung zeigt, daß kein Unterschied in der Affinität zum Antikörper zwischen ST-14 und Tyr-ST besteht. Zur Markierung mit Jod-125 fand die Chloramin T-Methode Anwendung (Hunter und Greenwood, 1962). 10 µg (in 10 µl 2 mM Azetatpuffer, pH 4,6) Tyr-ST werden zusammen mit 0,33 mCi (10 µl) NaJ¹²⁵ in 50 µl 0,5 M Phosphatpuffer (pH 7,4) gegeben. Tyr-ST ist zur Aufbewahrung in Aliquots zu 10 µg bei - 20°C tiefgefroren. Zu der Mischung werden 10 µl Chloramin T-Lösung zugefügt. Chloramin T wird in einer Konzentration von 2,5 mg/ml frisch in 0,1 molaren Phosphatpuffer (pH 7,4) aufgelöst.

Nach einer Reaktionszeit von 20 - 40 Sekunden bei Zimmertemperatur wird die Jodierung durch Zugabe von 20 µl Natriumdisulfit (2,5 mg/ml in 0,1 M Phosphatpuffer) gestoppt. Das radiojodierte Produkt wird anschließend sofort mit einem in der Literatur beschriebenen, modifizierten Verfahren (Arimura et al., 1975; Krohnheim et al., 1976) gereinigt. Die Trennung von markiertem Peptid und freiem Jod-125 erfolgt auf einer Carboxymethyl-Cellulose (CMC)-Kationenaustauschersäule (WHATMAN) mit den Maßen

5 x 1 cm, die mit 1 ml 1 %iger Rinderserumalbumin (BSA)-Lösung vorinkubiert wurde. Initial wird mit 2 mM Ammoniumazetatpuffer, pH 4,6 eluiert, bis ca. 20 mal 0,5 ml Fraktionen gesammelt wurden. Dann wird dieser Puffer durch 0,5 M Ammoniumazetatpuffer, pH 4,6 ersetzt und es werden damit noch ca. 30 mal 0,5 ml Fraktionen eluiert. Jede Fraktion wird in einem Gammacounter (BIOSIGMA) auf Radioaktivität gemessen.

Ergebnis (s. Abb. 8)

Neben einem ersten scharfen Peak an freiem Jod-125, der mit 2 mM Ammoniumazetatpuffer eluiert wurde, ergeben sich nach Pufferwechsel noch zwei Peaks von jodiertem Peptid, von denen der erste Peak oftmals verschwindend klein ist und bei der Testung mit Antiserum kaum Immunreaktivität zeigt; es handelt sich wahrscheinlich um verändertes ST oder um Peptidbruchstücke. Der zweite, größere Peak zeigt in der Regel gute Qualität für die Verwendung im RIA als Tracer. Es werden diejenigen Fraktionen mit der höchsten Zählrate gesammelt und zur Titration des Antiserums eingesetzt. In der Regel werden mehr als 90 % des eingesetzten Tracers von einem Überschuß an Antiserum gebunden, d.h. der Tracer hat eine gute Affinität zum Antikörper.

Titration des Somatostatinantiserums

Die Titration dient zur Ermittlung der geeigneten Antiserumverdünnung im Assay, d.h. derjenigen Verdünnung, bei der etwa 50 % (mindestens 30 %) des eingesetzten Tracers am Antikörper gebunden wird. Dazu wird der Somatostatin-Tracer auf ca. 6000 counts per minute (cpm) pro 100 µl verdünnt und mit einer Reihenverdünnung des ST-Antiserums inkubiert. Alle Bestimmungen werden in Dreifachansätzen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Inkubationsdauer beträgt 24 - 48 Stunden bei 4°C. Danach fügt man 50 µl Kaninchen-Gammaglobulinlösung (7 µg/µl) als Trägerprotein hinzu und präzipitiert sofort durch Zufügen von 100 µl einer 1 : 24 Verdünnung eines Anti-Kaninchen-Gammaglobulinserums (WELLCOME) und 500 µl Polyäthylenglycol (PEG)-Lösung (60 g/l Aqua dest.)

(Wood et al., 1979). Die Ansätze werden anschließend bei ca. 2000 g 30 Minuten lang zentrifugiert, der flüssige Überstand wird abgesaugt und verworfen; das Präzipitat, das den gebundenen Tracer enthält, wird in einem Gammacounter jeweils eine Minute lang gezählt. Eine typische Titrationskurve ist in Abb. 9 dargestellt. Eine 50 % Bindung findet man bei einer Antiserumverdünnung von 1 : 10000.

Standardkurve und Assayprotokoll

Zur Erstellung einer Standardkurve werden bekannte Mengen Somatostatin-14 zusammen mit Tracer und Antiserumverdünnung 24 bis 48 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Trennung des gebundenen und nichtgebundenen Tracers. Um unbekannte Mengen ST zu messen, werden außer den Standardlösungen, Aliquots der unbekannten Lösungen (z.B. Gewebsextrakte, Liquor) in den Assay eingesetzt.

Protokoll

	Puffer	PTB	Standard/Sample	Antiserum	125J-Tyr-ST
N	500 µl		---	---	100 µl
B	400 µl		---	100 µl	100 µl
Probe	200 µl		200 µl	100 µl	100 µl

Der Standard besteht aus synthetischem Somatostatin-14; die eingesetzte Konzentration für die Standardkurve geht von 1250 pg bis 0,63 pg, hergestellt als 1 : 2 - Reihenverdünnung in PTB-Puffer. Alle Ansätze werden in Tripletts durchgeführt. Das Endvolumen jedes Ansatzes beträgt 600 µl. Eine typische, reproduzierbare Standardkurve ist in Abb. 10 wiedergegeben. Die unspezifische Bindung ohne Zugabe von Antiserum lag bei 4 bis 6 % der zugegebenen 6000 cpm.

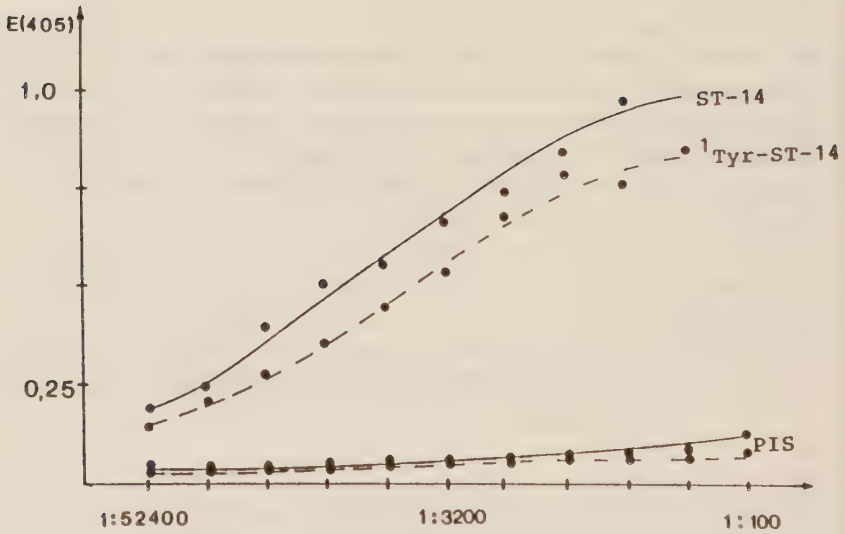


Abb. 7: Vergleich der Antigenität von ST-14 und ¹Tyrosin-ST im ELISA. Es besteht kaum ein Unterschied in der Bindung an den Antikörper. PIS = Präimmunserum

Tyr-ST: JODIERUNG

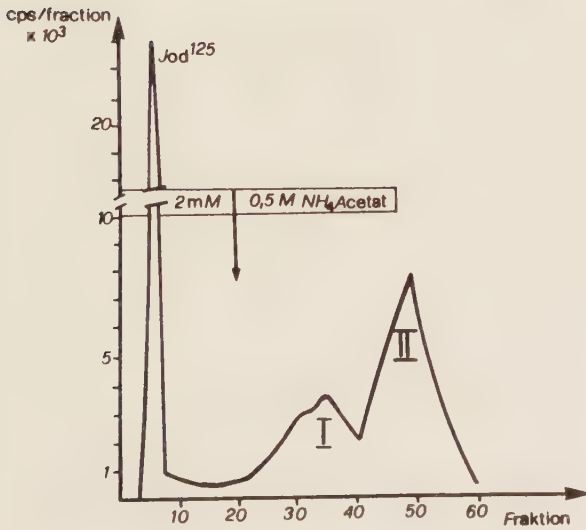


Abb. 8: Elutionsprofil einer Trennung von jodiertem Tyr-ST von freiem Jod-125 auf einer Carboxymethyl-Cellulose-Ionenaustauschersäule (5 x 1 cm, WHATMAN). Peak I enthält immunologisch inaktives Peptid oder Peptidbruchstücke; Peak II besteht aus immunologisch aktivem Tracer.

RIA: ST-ANTISERUM-TITRATION

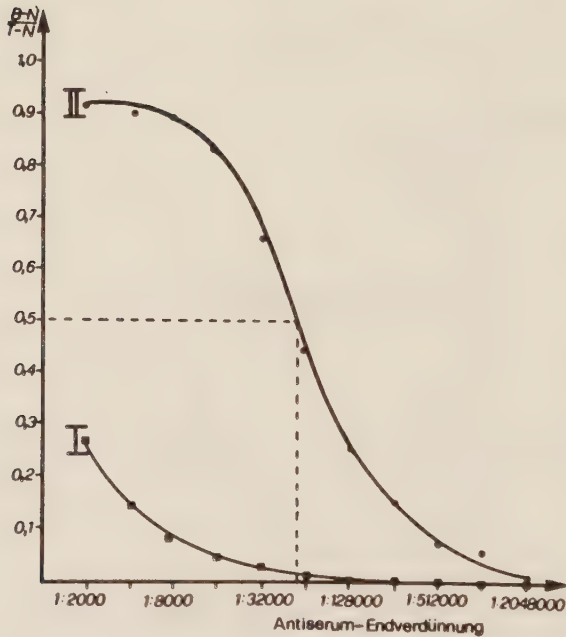


Abb. 9: Titration von ST-Antiserum K 107 im Radioimmunoassay; Peak I (vgl. Abb. 8) zeigt kaum Affinität zum Antikörper, dagegen bindet der Tracer aus Peak II zu mehr als 90 % mit dem Antikörper. Eine 50 %ige Bindung des Tracers liegt bei einer Antiserumverdünnung von 1 : 60000 vor.

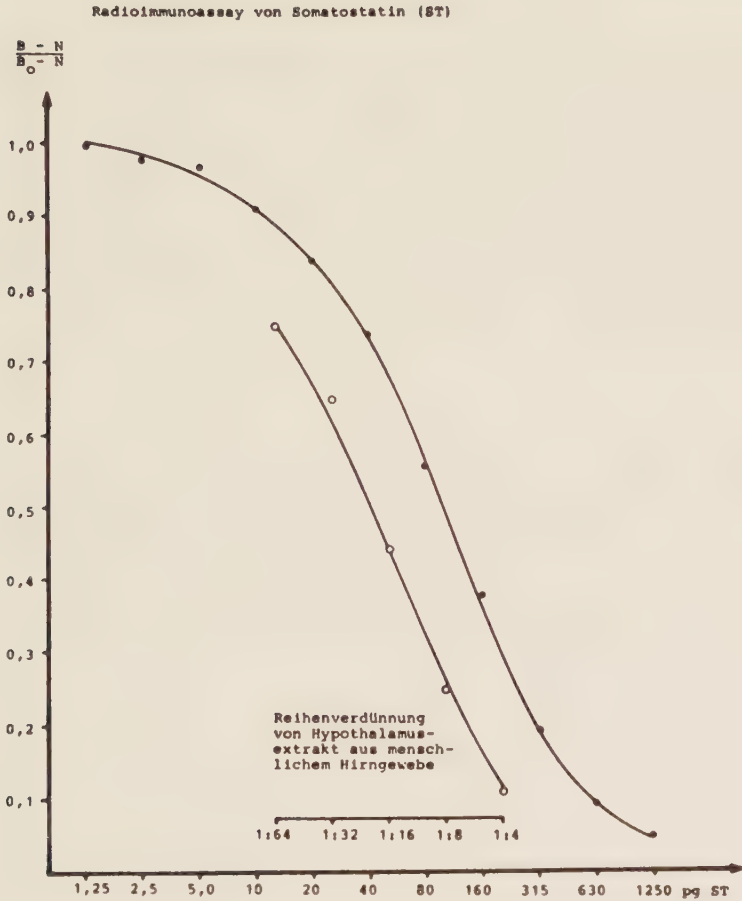


Abb. 10: Standardkurve des ST-Radioimmunoassay mit einer Meßgrenze von ca. 2 pg. Eine Reihenverdünnung von Hypothalamusextrakt aus menschlichem Gewebe zeigt einen parallelen Verlauf zur Standardkurve aus synthetischem Somatostatin-14.

b) Entwicklung eines Radioimmunoassay für Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP)

Jodierung

Die Markierung von VIP ist durch die Anwesenheit von zwei Molekülen Tyrosin innerhalb der Aminosäuresequenz sehr leicht möglich. Die Jodierung mit Chloramin T entspricht der beim ST-RIA beschriebenen Methode, ebenso die Trennung von Peptid und freiem Jod auf einer CMC-Ionenaustauschersäule. Als Trennungsergebnis erhält man einen kleinen, scharfen Peak an freiem Jod, sowie einen breiten Gipfel von ¹²⁵J-VIP, von dem die Fraktionen mit der höchsten Radioaktivität vereinigt und als Tracer verwendet werden (vgl. Abb. 11).

Titration

Nach Verdünnung des VIP-Tracers auf ca. 6000 cpm/100 µl erfolgt die Ermittlung der geeigneten Antiserumverdünnung. Die Durchführung ist im entsprechenden Abschnitt über Somatostatin erläutert. Die Titrationskurve ist in Abb. 11 dargestellt. Man erkennt eine 50 % - Bindung bei einer Serumendverdünnung von 1 : 18000, das entspricht einer Arbeitsverdünnung von 1 : 3000 (bei einem Endvolumen des Ansatzes von 600 µl).

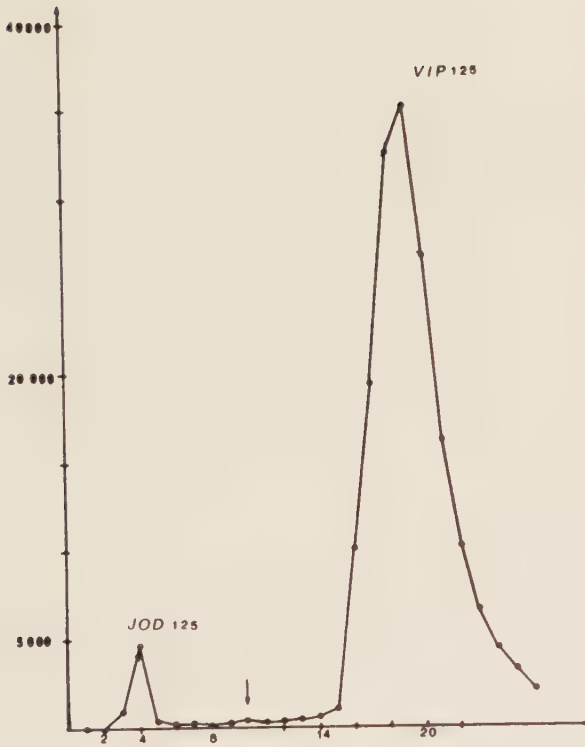


Abb. 11: Elutionsprofil einer Trennung von $^{125}\text{Jod-VIP}$ und freiem Jod-125 auf einer Carboxymethyl-Cellulose-Säule (5 x 1 cm; WHATMAN). Durch einen Pfeil ist der Pufferwechsel von 0,002-M zu 0,5-M Ammoniumazetat-Puffer, pH 4,6.

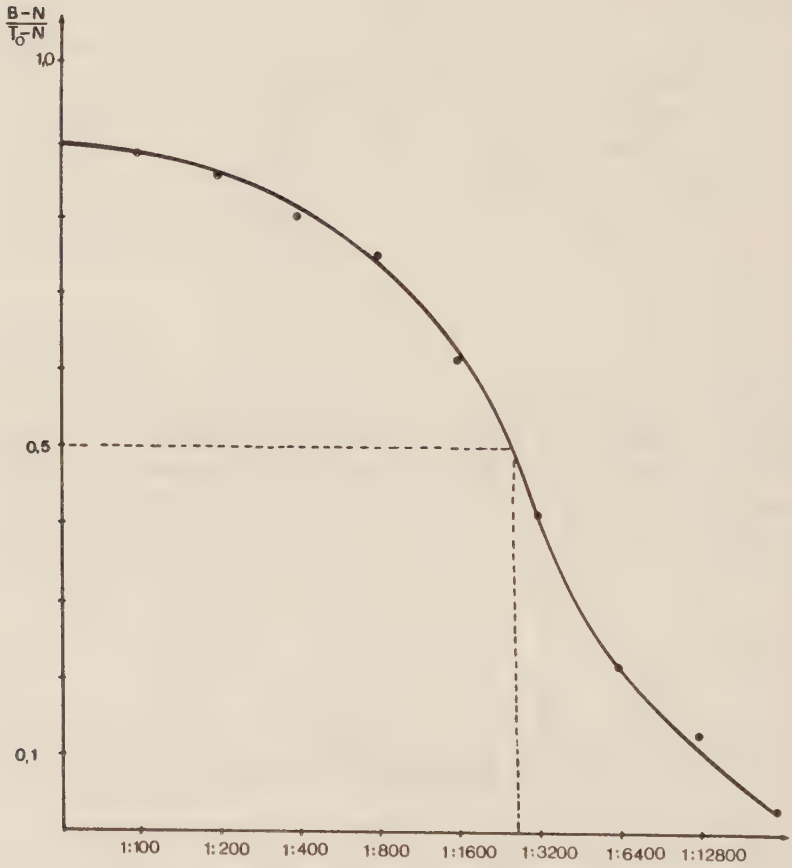


Abb. 12: Titrationskurve zur Ermittlung der 50 %-Bindung von Antiserum K 133 an ^{125}I -Jod-VIP. Eine geeignete Antiserumverdünnung für den RIA liegt bei 1 : 18000 Endverdünnung (1 : 3000 Arbeitsverdünnung).

Assayprotokoll

Der eingesetzte VIP-Standard besteht aus einer Reihenverdünnung von synthetischem VIP in Konzentrationen von 800 pg bis 1,5 pg pro Ansatz. Das Pipettierschema und die Trennungsmethode von gebundenem und freiem Tracer entspricht dem unter ST-RIA dargelegten Verfahren.

Spezifitätstests der RIAs für Somatostatin und VIP

Nach Testung der ST- bzw. VIP-Antiseren auf Kreuzreaktionen im ELISA, werden vergleichbare Tests auch im RIA durchgeführt, um auch in diesem Meßsystem eventuell unspezifisch interferierende Substanzen zu erkennen, bzw. Kreuzreaktionen mit anderen Peptiden auszuschließen. Hierzu werden, neben ST-14 bzw. VIP zur Erstellung der jeweiligen Standardkurve eine Vielzahl von Peptiden in verschiedenen Konzentrationsstufen (100 ng bis 100 pg) eingesetzt. Es wurden folgende Peptide, bzw. Proteine getestet: ACTH, LRH, Cholezystokinin, Arginin-Vasopressin, Arg-Vasotocin, Oxytocin, Neurophysin, Sekretin, Bombesin, Motilin, gastric inhibitory peptide (GIP), PHI, Gastrin, Substanz P, Glucagon, VIP (im ST-RIA), ST (im VIP-RIA) und Thyroglobulin.

Ergebnis

Die Kreuzreaktionen bei allen getesteten Peptiden bzw. Proteinen war kleiner als 0,5 %, selbst bei Konzentrationen, die den Standard um das Hundertfache übersteigen (Abb. 13).

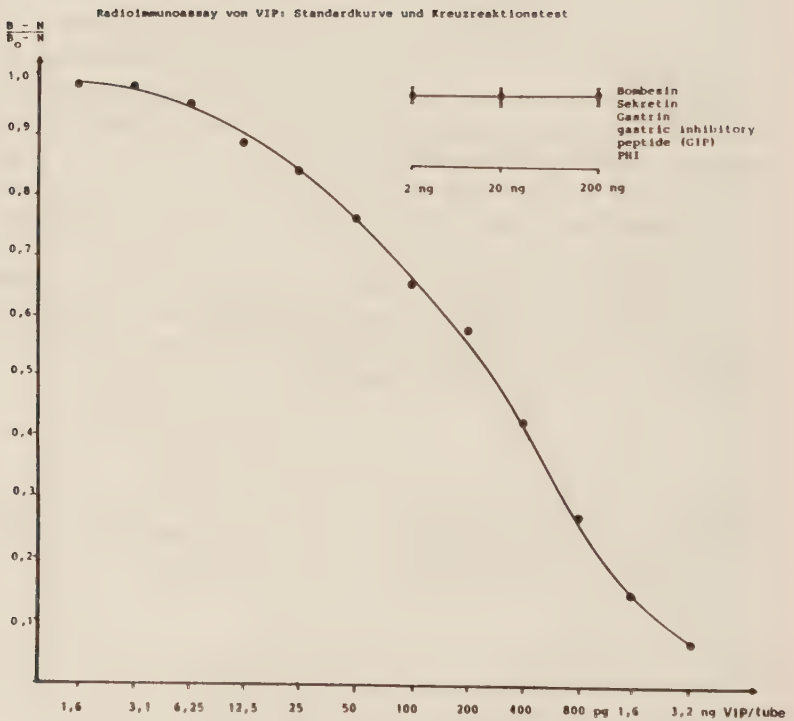


Abb. 13: Standardkurve des VIP-RIA mit einer Meßgrenze von 5 - 8 pg/tube. Die Peptide Bombesin, Sekretin, Gastrin, gastric inhibitory peptide (GIP) und PHI zeigen keine Kreuzreaktion mit dem VIP-Antiserum K 133.

4. Herstellung von Extrakten aus Hirngewebe zur quantitativen Bestimmung von Peptiden im Radioimmunoassay.

a) Gewebspräparation am Rattengehirn

Die verwendeten Laborratten (Sprague Dawley, männlich, Gewicht: 300 - 350 g) lebten unter Käfigbedingungen mit ad libitum Nahrungs- und Wasserzufuhr. Zur Entnahme des Gehirns werden die Tiere nach Äthernarkose durch Dekapitation getötet. Der abgetrennte Kopf wird in ein Stereotaxiegerät gespannt und bei eröffneter Schädeldecke werden ein bis zwei Frontalschnitte, gemäß den Koordinaten eines Hirnatlanten (König und Klippel, 1963) durchgezogen, damit die Frontalebene festgelegt ist, und die spätere Orientierung erleichtert wird. Danach werden die Gehirne rasch aus dem Schädel entnommen und in einem schnellkühlenden Medium (Trockeneis oder flüssiger Stickstoff/Methanol) tiefgefroren. Am Kryomat werden ca. 200 µm dicke Schnitte angefertigt, aus denen unter einem Stereo-Auflichtmikroskop die zu untersuchenden Areale entnommen werden. Die größeren Bezirke (z.B. Cortex cerebri, Caudato-Putamen, Globus pallidus) werden mittels Zirkumzision mit einer abgewinkelten ophthalmologischen Lanzette entnommen. Kleine Kernareale (Amygdala, Septumregion) werden durch Ausstanzen und vorsichtiges Absaugen mit Hilfe von selbsthergestellten Vorrichtungen aus Kanülen, zum Teil mit Kunststoffaufsätzen entnommen (Palkovits, 1973). Die entnommenen Gewebestückchen werden kurz auf Kochtemperatur erhitzt, um möglicherweise vorhandene Proteinase oder Peptidasen zu denaturieren. Anschließend wird 1-M Essigsäure oder 0,1-M Salzsäure zugegeben und mit Teflonstößeln mechanisch und daraufhin mit Ultraschall ("Sonifier") homogenisiert. Nach Zentrifugieren bei ca. 2000 g wird der Überstand, der die Peptide enthält, mit Natronlauge neutralisiert, lyophilisiert und das gefriergetrocknete Material bei -20°C bis zum RIA aufbewahrt. Für den Einsatz im Radioimmunoassay wird das getrocknete Material in Assay-Puffer aufgelöst. Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugieren entfernt.

b) Gewebspräparationen am menschlichen Gehirn

Es konnten vier menschliche Gehirne untersucht werden, deren postmortale Liegedauer kürzer als 12 Stunden war (6, 8, 9 und 10 Stunden). Das Alter der vier männlichen Patienten betrug 61 ± 6 Jahre. Keiner der Patienten hatte in der Krankengeschichte Hinweise auf neurologische oder psychiatrische Erkrankungen. Die makroskopische Untersuchung der Gehirne ergab keine Hinweise auf pathologische Veränderungen. Das Material wurde uns aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München (Vorstand: Prof. Dr. W. Spann) zur Verfügung gestellt.

Darüberhinaus untersuchten wir ein Gehirn eines Patienten, der an Morbus Parkinson litt (Alter: 67 Jahre), das uns aus dem pathologischen Institut des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität (Vorstand: Prof. Dr. W. Gössner) zur Verfügung gestellt wurde.

Ein Gehirn (postmortale Liegedauer: 6 Stunden) wurde sofort nach der Entnahme in einem kalten Raum bei 4°C in ca. 10 mm dicke Frontalscheiben zerlegt und die interessierenden Gewebssareale wurden durch Zirkumzision mit einem Skalpell entnommen, wobei besondere Sorgfalt darauf verwendet wurde, keine Teile einer Nachbarregion mitzunehmen. Die übrigen drei Gehirne aus dem Institut für Rechtsmedizin, sowie das Gehirn des Parkinson-Patienten wurden nach Entnahme tiefgefroren und bis zur Bearbeitung bei -28°C aufbewahrt. Dann wurden die Gehirne in einem Kryomat bei einer Temperatur von -5°C per Hand in ca. 10 mm dicke Frontalscheiben zerlegt und die Areale, wie oben, mit einem Skalpell exzidiert. Zur sicheren Identifizierung, gerade der kleinen Gebiete erfolgte die Orientierung unter Zuhilfenahme eines Hirnatlases (Nieuwenhuys, 1980). Die Gewebstücke wurden gewogen, kurz erhitzt und anschließend in 1-M Essigsäure (5 bis 10 : 1, Volumen : Gewicht) homogenisiert. Das Erhitzen des Gewebes dient der Denaturierung und damit Inaktivierung von Proteasen und Peptidasen. Die Homogenisation erfolgt wieder in Glashomogenisationsröhrchen mit Hilfe eines motorbetriebenen Teflonstößels. Der Extrakt wird durch Zugabe von Natronlauge neutralisiert. Als Indikator dient Phenolrot für kleinere Extraktvolumina oder ein pH-Meter für grö-

Bere Extraktmengen. Ein kleines Aliquot (200 - 400 μ l) wird für die Proteinbestimmung mit dem Folin-Reagenz nach Lowry (1951) aufbewahrt und der größere Teil des Extrakts wird bei 2000 g ca. 30 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand mit den Peptiden wird abpipettiert, in drei bis vier Proben aufgeteilt und tiefgefroren. Die Extrakte werden bei -20°C bis zum Assay aufbewahrt. Einigen Proben wurde vor den Homogenisations- und Präparationsschritten synthetisches ST-14 und VIP in bekannten Mengen zugegeben, um die Ausbeute an Peptid, bzw. evtl. Verluste desselben festzustellen.

5. Immunhistochemische Methoden für lichtmikroskopische Untersuchungen.

Gewebspräparationen

Junge Ratten wurden nach Anästhesie mit Nembutal durch Perfusion mit 50 ml physiologischer Kochsalz- oder Ringerlösung, sowie nachfolgend mit 150 bis 200 ml Bouin'scher Fixationslösung durch eine in der Aorta ascendens liegenden Knopfkanüle fixiert. Die Gehirne wurden herauspräpariert und in Bouin'scher Lösung nachfixiert. Die menschlichen Gehirne wurden sofort nach Entnahme bei der Autopsie in die zwei Hemisphären unterteilt, von denen eine für radioimmunologische, quantitative Peptidbestimmungen sofort präpariert oder tiefgefroren wurde (s. o.) und die andere Hemisphäre in Bouin'scher Lösung immersionsfixiert wurde. Nach ein bis zwei Stunden Anfixierung wurde das Gewebe durch Frontalschnitte in 10 mm dicke Scheiben geschnitten, die zwei bis drei Wochen immersionsfixiert wurden, wobei anfangs das Fixans täglich gewechselt wurde. Anschließend erfolgte die genaue Aufteilung in Blöcke mit zusammenhängenden Regionen und Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, Methylbenzoat und Benzol bis zur Einbettung in Paraffin. Aus diesen Gewebsblöcken wurden 7 μ m dünne Paraffinschnitte in Serie angefertigt. Kleine Blöcke wurden auf Schlittenmikrotomen geschnitten, große, bis zu 8 x 10 cm umfassende Hirnstücke auf einem Tetrander-Mikrotom.

Immunhistochemische Methodik

Die histologischen Schnitte werden für die indirekte Immunreaktion nach Sternberger (1979) vorbereitet. Dazu werden sie entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe bis Wasser, bzw. Tris-Puffer gebracht. Die Schnitte werden in Tris-Puffer (pH 7,8) gewaschen und dadurch von noch vorhandenem Fixans, insbesondere Pikrinsäure befreit. Daran anschließend erfolgt die immunhistochemische Darstellung der Peptide in mehreren Schritten.

Durchführung der immunhistochemischen Reaktion (Peroxidase-Antiperoxidase-Methode nach Sternberger), Abb. 14

- 1) Inkubation der Schnitte in einer Verdünnung 1 : 200 bis 1 : 1000) des spezifischen Antiserums in Tris-Triton-Carageenan-Puffer, pH 7,8 (1. Antikörper) bei 4°C für 24 bis 48 Stunden. Anschließend wird in Tris-Puffer (pH 7,8) mehrmals gewaschen.
- 2) Die Schnitte werden ca. 30 Minuten bei Zimmertemperatur in einem Anti-Kaninchen-IgG-Serum (1 : 50, 2. Antikörper; WELLCOME oder SIGMA) inkubiert und danach wieder durch Waschen sorgfältig von Antiserumüberschuß befreit.
- 3) Die Schnitte werden in eine 1 : 50 bis 1 : 70 Verdünnung von Kaninchen-Peroxidase-Antiperoxidase (PAP, hergestellt in Eigenproduktion, nach der von Sternberger angegebenen Methode) für ca. 20 Minuten inkubiert. Wiederum wird anschließend sorgfältig gewaschen.
- 4) Als Indikatorreaktion dient die enzymatische Umsetzung von löslichem Diaminobenzidin (DAB, SIGMA) durch Peroxidase zu unlöslichem Polymerisat, das eine braune Farbe besitzt. Dazu werden die Schnitte in eine frisch angesetzte Lösung von 1 mg/ml DAB in Tris-Puffer gegeben. Diese Lösung enthält außerdem 0,01 % Wasserstoffperoxid (Perhydrol). Die Reaktion wird nach 20 Minuten durch Herausnehmen der Schnitte beendet.

Es erfolgt nun noch eine Gegenfärbung mit Toluidinblau, bevor die histologischen Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert, in Xylol aufgehellt und mit DePeX eingedeckt werden. Unter dem Lichtmikroskop ist an Stellen, an denen der 1. Antikörper gebun-

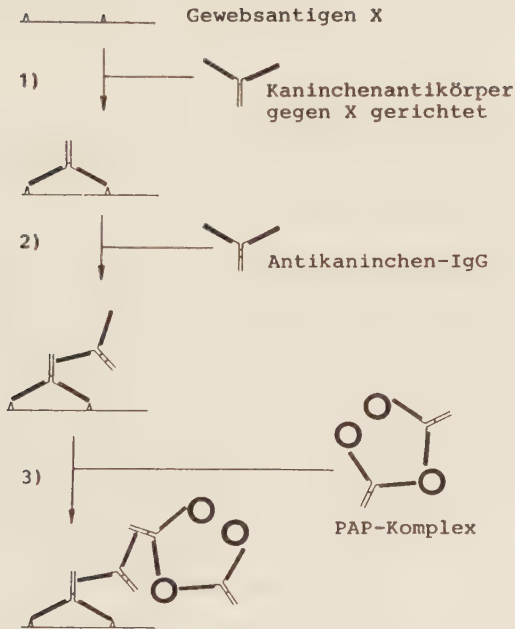


Abb. 14: Schema der immunhistochemischen Darstellung von Gewebsantigenen mit der Peroxidase-Antiperoxidase-Methode nach Sternberger (1979). (PAP = Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex)

den hat, ein tief braun gefärbtes Reaktionsprodukt erkennbar, das die Lokalisation von Neuropeptiden im Hirngewebe ermöglicht. Kontrollen werden durchgeführt, indem die Schnitte mit Antiserum inkubiert werden, das durch Zugabe von Antigen (1 µg/ml verdünntes Serum) inaktiviert war. Unter diesen Bedingungen wird auch eine spezifische Immunreaktivität am histologischen Schnitt unterdrückt.

6. Bestimmung der Konzentration von Somatostatin und VIP im Liquor cerebrospinalis bei Patienten mit Erkrankungen des Zentralnervensystems.

Es wurden sowohl Patienten mit degenerativen ZNS-Erkrankungen, als auch Kontrollpersonen, deren klinische Untersuchung kein organisch-neurologisches Defizit ergab, in diese Studie einbezogen. Die Liquoruntersuchungen konzentrierten sich auf Patienten mit Morbus Parkinson, Chorea Huntington, Morbus Wilson, hereditären spinocerebellären Erkrankungen und seniler Demenz vom Typ des Morbus Alzheimer. Ferner wurden Patienten untersucht, die an Amyotropher Lateralsklerose und Multipler Sklerose erkrankt waren. Die überwiegende Zahl der Patienten mit der Diagnose Chorea Huntington stammte aus der Rheinischen Landesklinik, Düsseldorf (Psychiatrische Klinik, Direktor: Prof. Dr. Heinrich). Der größte Teil der übrigen Patienten stammte aus der Neurologischen Klinik der Technischen Universität München (Direktor: Prof. Dr. A. Struppler), sowie ein kleiner Teil aus der neurologischen Klinik der Universität München, Klinikum Großhadern (Direktor: Prof. Dr. Th. Brandt). Bei den Patienten wurde hauptsächlich zum Ausschluß von entzündlichen Erkrankungen des ZNS eine Lumbalpunktion durchgeführt. Die Patienten wurden jeweils am frühen Vormittag lumbalpunktiert, um mögliche circadiane Schwankungen (Arnold et al., 1982) weitgehend auszuschließen. Die ersten beiden Proben von jeweils ca. 5 ml wurden für Routine-Laboruntersuchungen verwendet. Die dritte Probe wurde in kleine Portionen aufgeteilt, sofort nach Entnahme tiefgefroren und bei -20°C aufbewahrt. Die

Peptide ST und VIP wurden radioimmunologisch gemessen; jeweils 0,2 ml Liquor wurde als Sample in Dreifachansätzen im RIA eingesetzt (vgl. Abschnitt 3).

Ergebnisse

1. Somatostatin-Radioimmunoassay

Es wurde ein empfindlicher und spezifischer Radioimmunoassay zur Bestimmung von ST entwickelt. Die Empfindlichkeit des RIA, mit einer Nachweisgrenze von 1 - 2 pg, ist vergleichbar mit Literaturberichten (Arimura et al., 1975; Krohnheim et al., 1976). Mittels des RIA konnte ST quantitativ im Hirngewebe der Ratte und des Menschen sowie in Körperflüssigkeiten, speziell im Liquor nachgewiesen werden.

Quantitative Verteilung von ST-Immunreaktivität im Rattengehirn

Als Vorstudie und als methodischer Test bestimmten wir Somatostatin in Homogenaten aus Stanzproben von 200 - 300 µm dicken Kryomatschnitten von vier Rattengehirnen. Das Ergebnis wurde auf den Proteingehalt bezogen und ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Somatostatin-Immunreaktivität in verschiedenen Hirnarealen der Ratte (n = 4)

Gewebsareal	ST (ng/mg Protein) (Mittelwert $\pm$ Standard- abweichung)		
Bulbi olfactorii	0,12	$\pm$	0,017
Tuberculum olfactorium	6,04	$\pm$	0,1
Cortex frontalis	0,92	$\pm$	0,07
Cortex centralis	0,16	$\pm$	0,018
Cortex occipitalis	0,09	$\pm$	$2,2 \cdot 10^{-3}$
Hippocampus (dorsal)	0,11	$\pm$	0,015
Caudato-Putamen	0,49	$\pm$	0,017
Globus pallidus	1,21	$\pm$	0,11
Septum	1,13	$\pm$	0,42
Eminentia mediana	212,3	$\pm$	44,8
Nucleus accumbens	4,04	$\pm$	0,12
Nucleus amygdaloideus	1,7	$\pm$	0,68
Nucleus interpeduncularis	2,2	$\pm$	0,61
Pyramis	0,38	$\pm$	0,05
Cerebellum	0,014	$\pm$	$3,8 \cdot 10^{-3}$

Die weitaus höchsten Werte ergaben Proben aus dem Bereich der Eminentia mediana des Hypothalamus, mit großem Abstand folgen solche aus dem Nucleus accumbens und dem Tuberculum olfactorium. Im Nucleus amygdalae, im Cortex cerebri und in den Basalganglien finden wir ebenfalls noch deutlich meßbare Mengen von ST-Immunreaktivität. Die niedrigsten Konzentrationen waren im Cerebellum zu finden. Im ganzen ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit eigenen immunhistochemischen Befunden am Rattengehirn und solchen in der Literatur (Bennett-Clarke et al., 1980), sowie früheren quantitativen Untersuchungen (Krohnheim et al., 1976; Brownstein et al., 1975). Aus den Ergebnissen konnten wir folgern, daß unsere Methode sich auch zu Messungen am menschlichen Gewebe eignet.

Radioimmunologische Bestimmung von ST im menschlichen Gehirn

In analoger Weise zum Rattengehirn wird die Verteilung von ST-Immunreaktivität in menschlichen Gehirnen gemessen. Das Ergebnis zeigt Tabelle 2. Die höchsten Konzentrationen von ST-IR finden wir im Hypothalamus. Ebenfalls hohe Werte sind im Corpus amygdaloideum und im Hippocampus vorhanden. In den Basalganglien ist ST in allen Regionen nachweisbar, vor allem im Globus pallidus internus und im Nucleus caudatus. Im Cortex cerebri ist Somatostatin in deutlichen Mengen nachweisbar; es findet sich kein signifikanter Unterschied der Verteilung in den verschiedenen corticalen Abschnitten.

Die niedrigsten Werte an ST-Immunreaktivität sind im Cerebellum und seinen Kernen (z. B. Nucleus dentatus) und in der weißen Substanz des Centrum semiovale enthalten.

Im Hirnstamm lassen sich, entsprechend der weiten Verbreitung von Somatostatin, ebenfalls meßbare Mengen zeigen.

Tabelle 2: Verteilung von Somatostatin in verschiedenen Regionen des menschlichen Gehirns (4 - 10 Stunden post mortem)

Hirnregion	ST (ng/mg Protein)	
	Mittelwert $\pm$ SEM	n
Cortex frontalis	1,72 $\pm$ 0,82	4
Cortex centralis	1,61 $\pm$ 0,46	4
Cortex temporalis	1,87 $\pm$ 0,32	3
Cortex occipitalis	1,41 $\pm$ 0,28	4
Insula	1,46 $\pm$ 0,49	3
Cingulum	1,29 $\pm$ 0,29	2
Centrum semiovale	0,06 $\pm$ 0,01	2
Corpus callosum	0,03 $\pm$ 0,01	2
Septum ventrale	0,86	1
Nucleus caudatus	2,67 $\pm$ 1,02	3
Putamen	1,50 $\pm$ 0,60	3
Globus pallidus internus	4,53 $\pm$ 1,45	3
Globus pallidus externus	1,85 $\pm$ 0,67	3
Thalamus	1,46 $\pm$ 0,67	3
Hypothalamus	18,32 $\pm$ 3,08	3
Amygdala	4,76 $\pm$ 1,98	3
Hippocampus	3,22 $\pm$ 1,85	4
Lamina quadrigemina	0,76 $\pm$ 0,16	2
Mesencephalon	1,35 $\pm$ 0,37	3
Cortex cerebelli	0,01 $\pm$ 0,005	4
Nucleus dentatus	0,01 $\pm$ 0,003	3
Corpus pineale	0,04 $\pm$ 0,014	3
Pons	3,09 $\pm$ 1,24	4

n = Anzahl der Extrakte und Messungen; Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit dem Folin-Reagenz nach Lowry (1951) bestimmt.

2. Immunhistochemische Darstellung von Somatostatin im ZNS des Menschen.

Somatostatin-immunreaktive (ST-IR) Neurone und Fasern sind zahlreich im Hypothalamus darstellbar, insbesondere im Nucleus ventromedialis und in der periventrikulären Region (Abb. 15). ST-IR Fasern und Perikaryen finden sich ebenfalls sehr zahlreich im Nucleus infundibularis. Eine große Anzahl von Fasern zieht zum Infundibulum, wo sie die Blutkapillaren des hypothalamo-adenohypophysären Portalkreislaufes dicht umgeben (Abb. 16 - 18). Auf diesem Weg erreicht das hypothalamische Wachstumshormon Release-Inhibiting-Hormon ST den Hypophysenvorderlappen und beeinflusst dort die Abgabe von Wachstumshormon.

Einige Terminale lassen sich im Nucleus suprachiasmaticus und im Nucleus paraventricularis darstellen. Zahlreiche ST-IR Fasern sind in der Stria terminalis lokalisiert (Abb. 19, 20 und 22). Darüberhinaus findet man ST-IR Neurone im Nucleus interstitialis striae terminalis (Abb. 21).

Im Corpus amygdaloideum finden wir somatostatinerge Perikaryen und zahlreiche Fasern in allen Anteilen des Kernkomplexes, insbesondere in den Nuclei centralis, basalis und lateralis (Abb. 23 a - e). Ebenfalls zahlreiche Neurone und Fasern mit ST-Immunreaktivität stellen sich im Hippocampus, im Bereich des Cornu ammonis und des Subiculum dar (Abb. 24 a - c). ST-IR Neurone und Fasern sind darüberhinaus im Gyrus cinguli (Abb. 25 a, b) lokalisiert. Im Cortex cerebri können ST-IR Neurone mit auf- und absteigenden Fortsätzen in den Schichten II - VI dargestellt werden. In den Abbildungen 26 - 28 sind ST-IR Perikaryen und Fasern im Bereich des Cortex frontalis, centralis und des Cortex insulae gezeigt. Weiterhin konnten einige positive Zellen innerhalb der weißen Substanz beobachtet werden.

Außerordentlich viele ST-IR Neurone sind in den Basalganglien enthalten, insbesondere im Nucleus caudatus und im Putamen. Hier stellen sich kleine Nervenzellen mit stark verzweigten Fortsätzen dar, bei denen es sich wahrscheinlich um Interneurone handelt (Abb. 29 a - c, 30 und 31 a, b). Eine Projektion dieser Neurone

in Regionen außerhalb des Striatums konnte nicht beobachtet werden.

Im Mesencephalon lassen sich Neurone im Nucleus interpeduncularis und im Bereich des Tectum mesencephali (Abb. 33) darstellen, sowie zahlreiche Fasern im zentralen Höhlengrau um den Aqueductus cerebri (Abb. 32 a, b).

In den Raphekernen des Hirnstammes sind neben zahlreichen ST-IR Fasern (Abb. 35) auch einige positive Perikaryen nachweisbar. Darüberhinaus sind einige Fasern in der Formatio reticularis zu erkennen.

In der Medulla oblongata finden sich ST-IR Fasern im Nucleus ambiguus (Abb. 36), Nucleus tractus solitarii (Abb. 37) und im Nucleus dorsalis nervi vagi (Abb. 38), sowie Fasern und Terminale, die als Boutons Zellen innerhalb des Nucleus olivarius inferior umgeben (Abb. 34 a, b).

Im Rückenmark sind ST-IR Fasern hauptsächlich in der Substantia gelatinosa des Hinterhorns lokalisiert (Abb. 39). Darüberhinaus findet man einige Varikositäten im Bereich der Substantia grisea centralis.

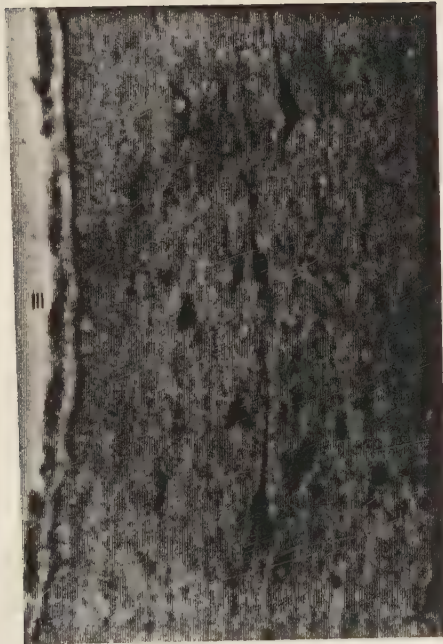
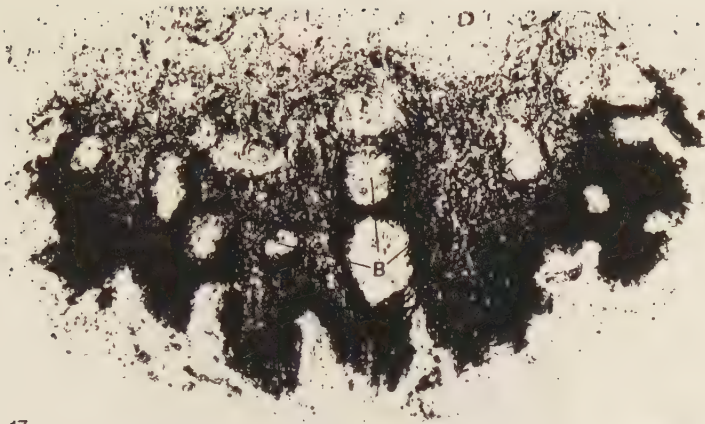


Abb. 15: Frontalschnitt durch den Hypothalamus des menschlichen Gehirns. Somatostatin-immunreaktive Perikaryen und Fasern im Nucleus periventricularis hypothalami (250 x).

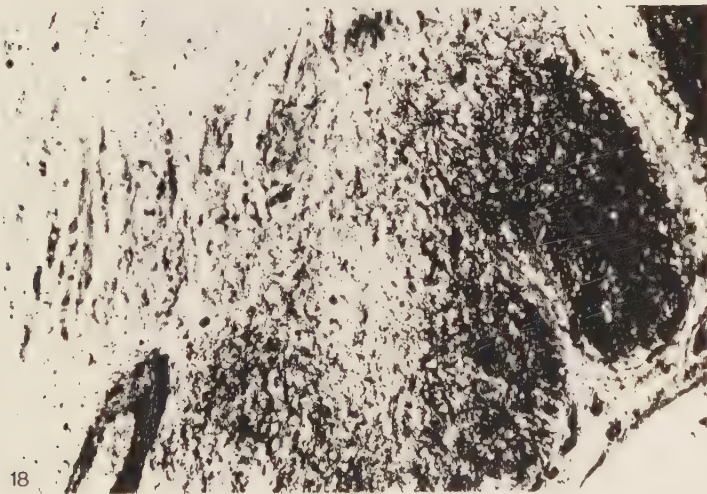


16

Abb. 16: ST-immunreaktive Fasern im Infundibulum, welche die portalen Kapillaren dicht umgeben. ST-Perikaryen und Fasern im Nucleus infundibularis (Nu. inf.) und in der Region um den III. Ventrikel (III). Zeichnung nach histologischem Präparat (Inf. = Infundibulum; ca. 20 x).



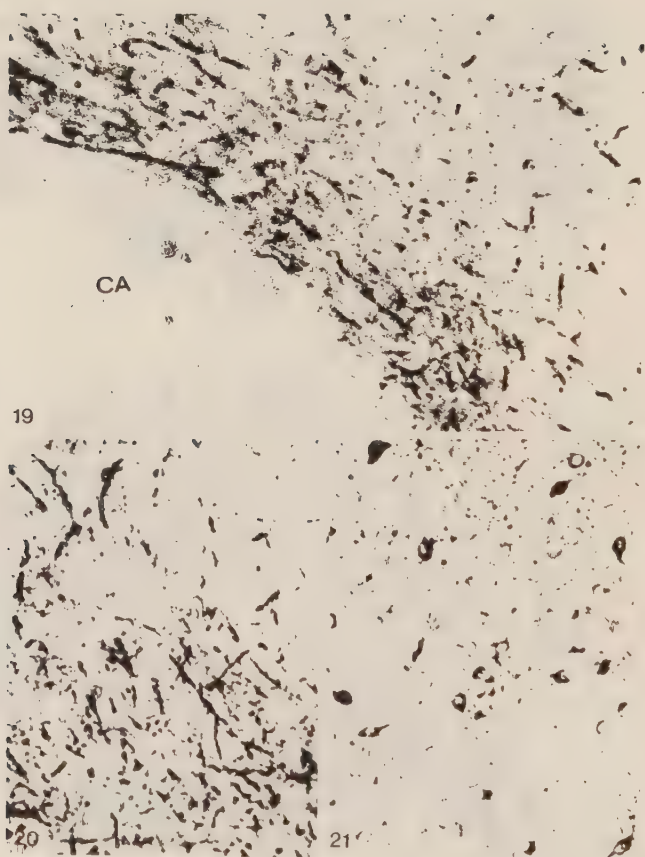
17



18

Abb. 17: Frontalschnitt durch das Infundibulum des Menschen mit dichten ST-immunreaktiven Fasern und Terminalen, die die Kapillaren des portalen Blutkreislaufs eng benachbart umgeben (B = Blutgefäße; 100 x).

Abb. 18: Sagittalschnitt durch das Infundibulum des Menschen (160 x).



- Abb. 19: Frontalschnitt durch das menschliche Gehirn in Höhe der Commissura anterior mit dichten ST-IR Faserbündeln in der Stria terminalis (CA = Commissura anterior; 250 x).
- Abb. 20: ST-IR Fasern in der Stria terminalis im Bereich des medialen Randes des Nucleus caudatus (250 x).
- Abb. 21: ST-IR Perikaryen im Nucleus interstitialis striae terminalis des menschlichen Gehirns (200 x).

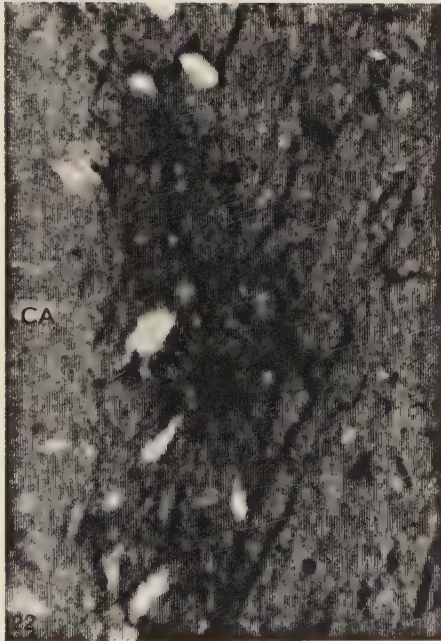


Abb. 22: ST-immunreaktive Faserbündel in der Stria terminalis.
Interferenzkontrastaufnahme eines Frontalschnittes
durch das Gehirn des Menschen im Bereich der Commissura
anterior (CA) 250 x.

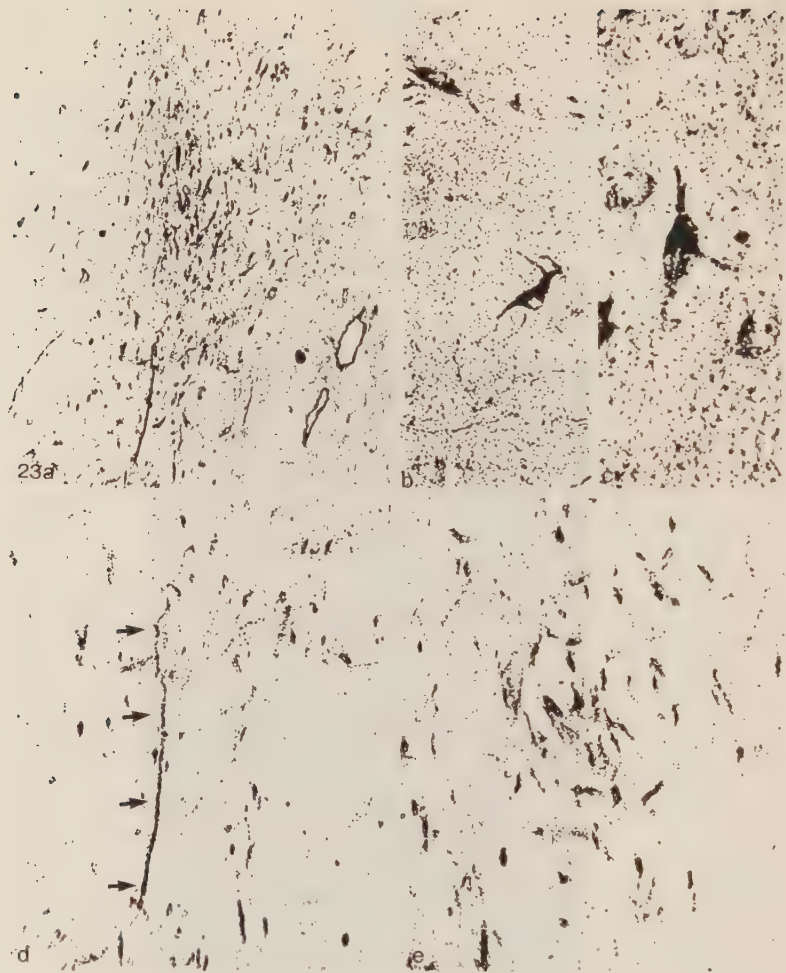


Abb. 23 a - e: Frontalschnitt durch das Corpus amygdaloideum des Menschen. a) ST-IR Fasern im Nucleus basalis (100 x). b und c) ST-IR Neurone im Nucleus lateralis (b 250 x; c 400 x). d) Ausschnittsvergrößerung von a mit positiver ST-Immunreaktivität (250 x). Mit Pfeilen gekennzeichnet ist eine längs angeschnittene ST-IR Faser. e) Immunreaktive Fasern und Varikositäten im Nucleus centralis (250 x).



Abb. 24 a - c: Frontalschnitt durch den dorsalen Hippocampus des Menschen. a) ST-immunreaktive Perikaryen (➔) im Cornu ammonis, CA 4 (250 x). FD = Körnerzellschicht der Fascia dentata. b und c) Kleine Neurone mit verzweigten Fortsätzen im Bereich des Subiculum (250 x).

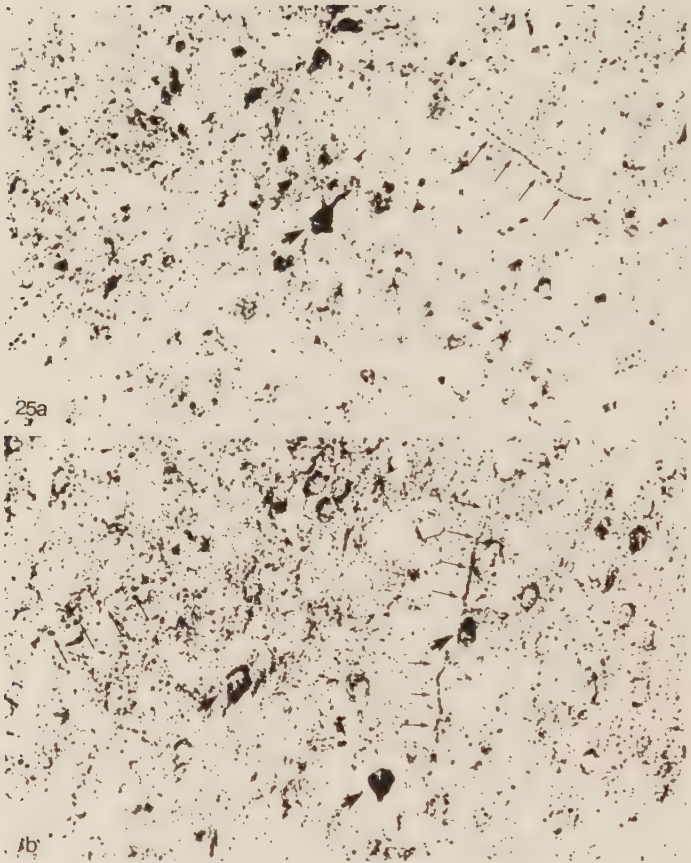


Abb. 25 a, b: Frontalschnitt durch den Gyrus cinguli beim Menschen. ST-IR Perikaryen mit Fortsätzen (➤) und zahlreiche Fasern, von denen einige mit Pfeilen (→) hervorgehoben werden (250 x).



Abb. 26 a, b: Frontalschnitt durch den Cortex insulae des Menschen mit somatostatinergen Neuronen und Fasern in allen Schichten, insbesondere in den Laminae II - VI (a 100 x; b 250 x).

Abb. 27: Cortex frontalis mit einem ST-IR Neuron und zahlreichen Varikositäten (160 x).

Abb. 28: ST-IR Nervenzelle in Lamina IV des menschlichen Cortex centralis (250 x).

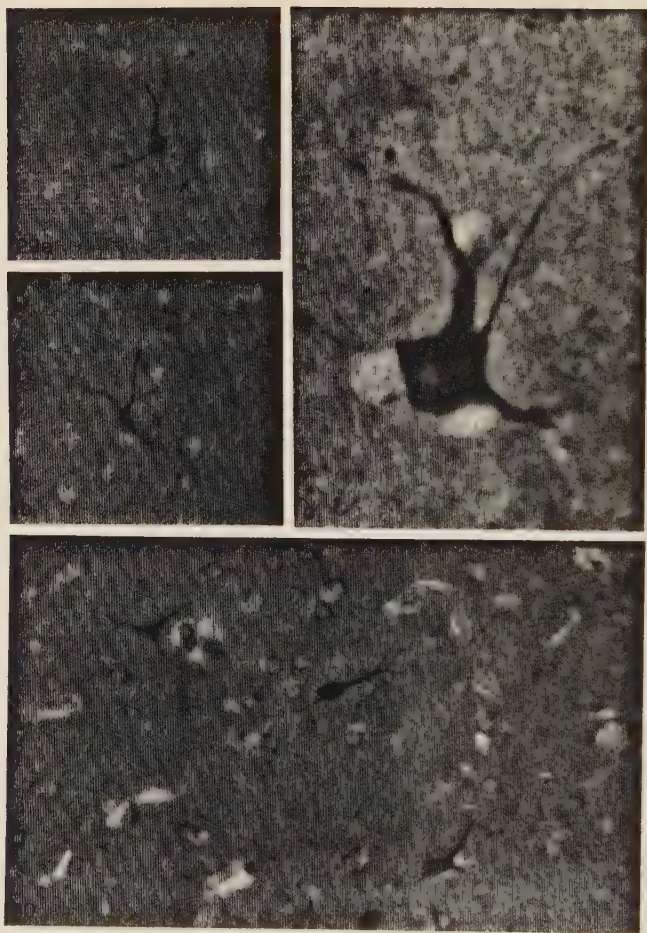


Abb. 29 a - c: Frontalschnitt durch das Caput nucleii caudati des menschlichen Gehirns. Darstellung von ST-IR Nervenzellen mit verzweigten Fortsätzen. Interferenzkontrastaufnahmen (a, b 250 x; c 1000 x).

Abb. 30: Frontalschnitt durch das menschliche Putamen mit ST-IR Neuronen. Interferenzkontrastaufnahme (250 x).



31 a



b

Abb. 31 a, b: Zeichnung typischer kleiner bis mittelgroßer ST-
Neurone im Striatum des Menschen. Vibratomschnitt
40 μm (ca. 300 x). a) Nucleus caudatus; b) Putamen

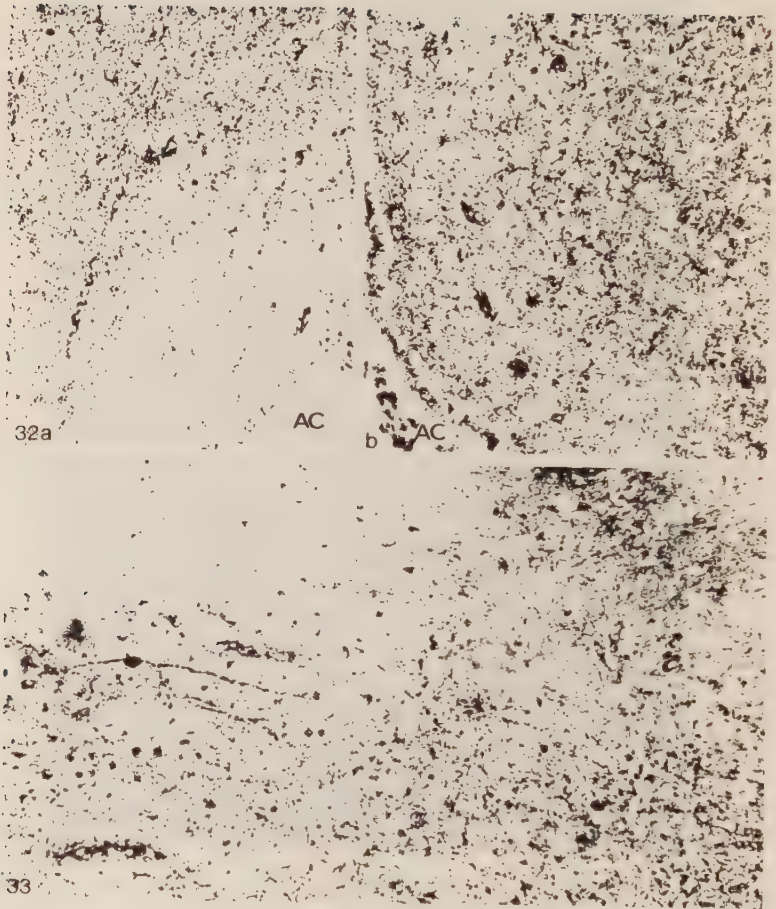


Abb. 32 a, b: Querschnitt durch das Mesencephalon des Menschen in Höhe der vorderen Zueihügel. Zahlreiche ST-IR Fasern umgeben das periaquäduktale Grau. AC = Aquaeductus cerebri (160 x).

Abb. 33: ST-IR Fasern im Tectum mesencephali beim Menschen (250 x).

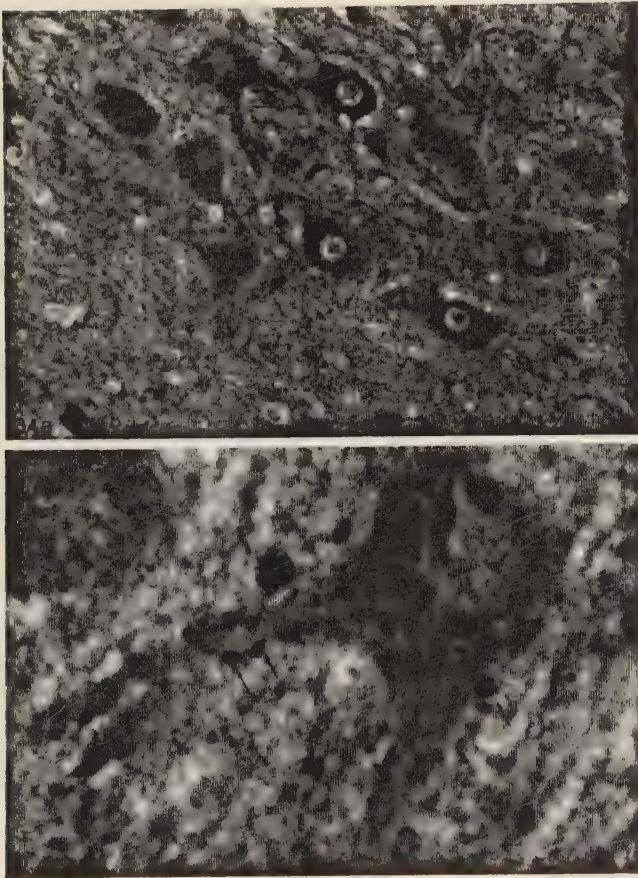


Abb. 34 a, b: Querschnitt durch den Hirnstamm des Menschen. ST-IR Fasern und Terminalen im Nucleus olivaris inferior. Mit Pfeilen (→) sind Boutons gekennzeichnet, die unmittelbar an den Neuronen enden. Die Zellen selbst enthalten Neurolipofuszin und zeigen keine Immunreaktivität (a 250 x; b 1000 x).

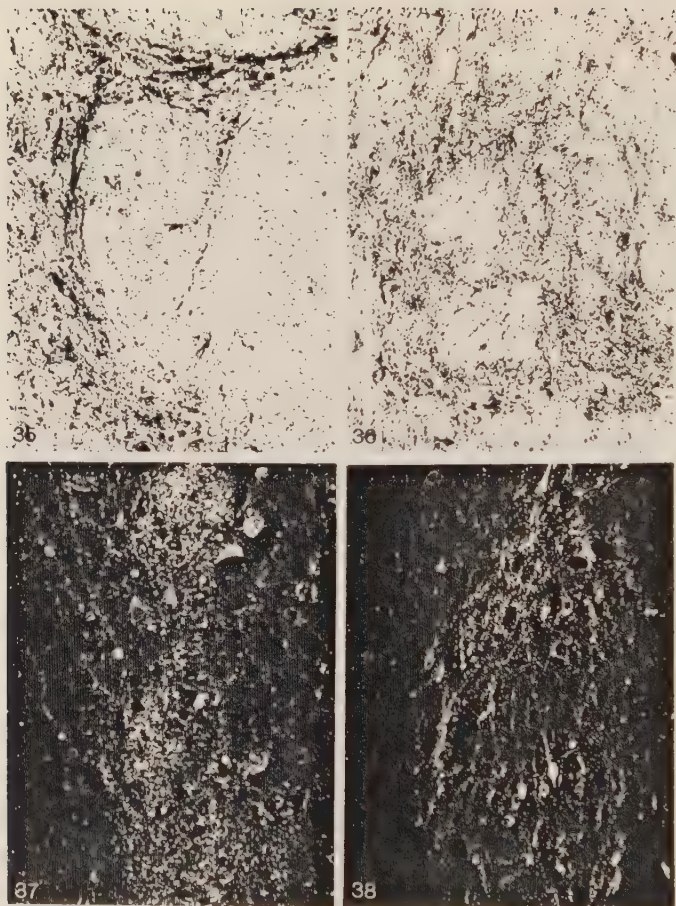


Abb. 35 - 38: Querschnitte durch den Hirnstamm des Menschen.

Abb. 35: Schnitt in Höhe der Olive. ST-IR Fasern in der dorsalen Raphe (160 x).

Abb. 36: ST-IR Fasern und Terminalen im Nucleus ambiguus (160 x).

Abb. 37: ST-IR Fasern und Terminalen im Nucleus tractus solitarii. Dunkelfeldaufnahme (160 x).

Abb. 38: ST-IR Fasern im Nucleus dorsalis nervi vagi. Dunkelfeldaufnahme (160 x).



39

Abb. 39: Querschnitt durch das Cervikalmark des Menschen. Darstellung von ST-IR Varikositäten und einigen Perikaryen (→) im Hinterhorn (250 x).

3. VIP-Radioimmunoassay

Der Assay zur Bestimmung von Vasoaktivem Intestinalem Polypeptid im Gewebe und im Liquor cerebrospinalis ist für das Peptid spezifisch und hat eine obere Nachweisgrenze von 5 - 8 pg. Er ist damit vergleichbar mit RIAs aus der Literatur (Ebeid et al., 1976; Fahrenkrug und Schaffalitzky de Muckadell, 1976).

Bestimmung von VIP-Immunreaktivität im menschlichen Hirngewebe

Tabelle 3 zeigt die quantitative Verteilung von VIP-Immunreaktivität (VIP-IR) in Regionen des menschlichen Gehirns. Es zeigt sich, daß die höchsten Konzentrationen von VIP-IR im Cortex cerebri und im Hippocampus vorkommen. Ebenfalls große Mengen des Neuropeptides lassen sich in den Amygdalakernen nachweisen. Dagegen ist die meßbare VIP-Immunreaktivität im Hypothalamus und in den Basalganglien deutlich geringer. Nicht, oder kaum nachweisbare Mengen des Peptids finden sich im Kleinhirn.

Tabelle 3: Verteilung von VIP in verschiedenen Regionen des menschlichen Gehirns (4 - 10 Stunden post mortem)

Hirnregion	VIP (ng/mg Protein) Mittelwert $\pm$ SEM)	n
Cortex frontalis	1,81 $\pm$ 0,17	2
Cortex centralis	2,94 $\pm$ 0,40	3
Cortex temporalis	3,59 $\pm$ 0,16	2
Cortex occipitalis	3,83 $\pm$ 0,84	3
Insula	1,55 $\pm$ 0,05	2
Hippocampus	2,29 $\pm$ 0,38	3
Nucleus caudatus	0,95 $\pm$ 0,37	2
Putamen	0,81 $\pm$ 0,07	2
Globus pallidus externus	0,68 $\pm$ 0,09	2
Globus pallidus internus	1,31 $\pm$ 0,42	2
Amygdala	1,24 $\pm$ 0,32	2
Thalamus	0,44 $\pm$ 0,14	3
Hypothalamus	0,60 $\pm$ 0,11	3
Lamina quadrigemina	0,74	1
Cerebellum	0,10 $\pm$ 0,05	3
Pons	0,35 $\pm$ 0,11	2

n = Anzahl der Messungen;

4. Immunhistochemische Darstellung von VIP im Gehirn der Ratte.

VIP-Immunreaktivität (VIP-IR) ist in Perikaryen vor allem in telencephalen Strukturen des ZNS enthalten. Im Neocortex ist VIP-IR in zahlreichen Neuronen lokalisiert, welche dünne, auf- und absteigende Fasern besitzen (Abb. 40 und 41). Die VIP-positiven Zellen sind in allen corticalen Schichten zu finden, hauptsächlich sind sie jedoch in Schicht II und III lokalisiert. VIP-IR Perikaryen lassen sich auch im Hippocampus und im Corpus amygdaloideum, sowie im Nucleus interstitialis der Stria terminalis darstellen.

Außerhalb dieser Regionen finden wir VIP-IR im Nucleus supraopticus (Abb. 44), sowie in dicht gelagerten Nervenzellen des Nucleus suprachiasmaticus, besonders innerhalb einer ventralen und caudalen Subpopulation dieses Kerns (Abb. 42). Daneben ist VIP-IR in einigen Neuronen des Nucleus paraventricularis nachweisbar (Abb. 43).

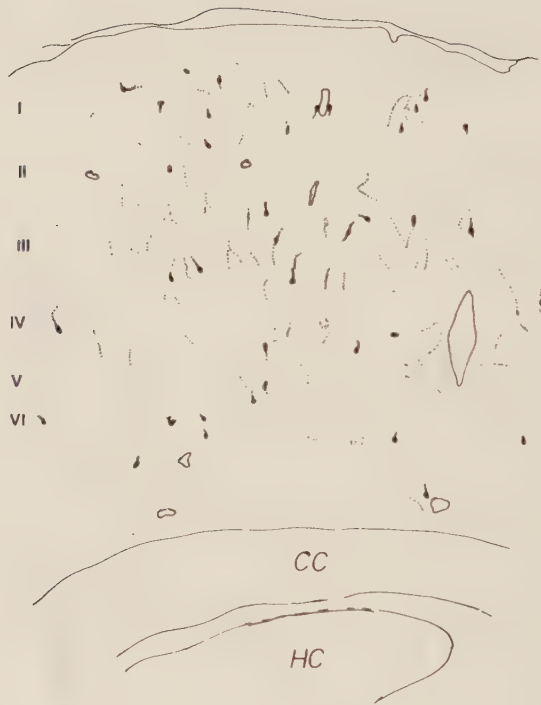
VIPerge Fasern sind in allen Regionen mit VIP-positiven Zellen auffindbar, insbesondere im Neocortex, Hippocampus und im Corpus amygdaloideum. Im Diencephalon sind VIP-IR Fasern dicht gelagert im Nucleus suprachiasmaticus nachweisbar. Weiterhin sind Fasern geringer Dichte im Hypothalamus und in der Eminentia mediana lokalisiert.

Einige Varikositäten werden im zentralen Höhlengrau rings um den Aquädukt im Mesencephalon gefunden.

Die folgenden Abbildungen zeigen VIP-IR Perikaryen und Fasern in einigen telencephalen und diencephalen Regionen des Gehirns der Ratte.



Abb. 40 a - c: Frontalschnitt durch den Cortex centralis der Ratte. a und b zeigen Übersichtsaufnahmen mit zahlreichen VIP-IR Zellen und Fasern (160 x). c zeigt eine Ausschnittsvergrößerung von a mit zwei VIP-IR Nervenzellen (630 x).



41

Abb. 41: Zeichnung eines Frontalschnittes durch den Cortex centralis der Ratte. VIP-IR Perikaryen und Fasern sind in allen Schichten des Cortex lokalisiert, insbesondere in den Laminae II und III (ca. 80 x). CC = Corpus callosum; HC = Hippocampus

III

42



Abb. 42: Frontalschnitt durch den Nucleus suprachiasmaticus der Ratte. VIP-IR Perikaryen und Terminalen (160 x).

Abb. 43: Frontalschnitt durch den Nucleus paraventricularis der Ratte. Subpopulation von Neuronen mit VIP-Immunreaktivität; es lassen sich nur wenige Terminale darstellen (250 x).



Abb. 44: Zeichnung eines Frontalschnitts durch das Rattegehirn in Höhe des Chiasma opticum. VIP-IR Perikaryen und Fasern im Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis, sowie wenige positive Neurone und Fasern periventriculär um den III. Ventrikel (III). CO = Chiasma opticum; SO = Nucleus supraopticus; PV = Nucleus paraventricularis (ca. 80 x).

5. Bestimmung der Peptide Somatostatin und VIP im Liquor cerebrospinalis von Kontrollpersonen und Patienten mit Erkrankungen des Zentralnervensystems.

Somatostatin

Bei Kontrollpersonen lag die ST-Konzentration im Liquor bei $146,7 \pm 7,8$ pg/ml (Mittelwert $\pm$ SEM). Ein alters- oder geschlechtsbezogener Unterschied war nicht festzustellen. Die ST-Werte waren signifikant erniedrigt bei Patienten mit Morbus Parkinson, sowie bei zwei Patienten mit M. Wilson (hepatolentikuläre Degeneration aufgrund einer pathologischen Kupferspeicherung). Erniedrigte ST-Konzentrationen wurden ferner gefunden bei Patienten mit seniler Demenz vom Typ des Morbus Alzheimer. Bei Chorea major Huntington, dem autosomal dominant vererbten Veitstanz, ergab sich insgesamt kein Unterschied zur Kontrollgruppe, jedoch waren innerhalb der Patienten eine Gruppe mit niedrigen ST-Werten und ein zweites Patientenkollektiv mit ST-Konzentrationen innerhalb des Kontrollbereiches. Es ließen sich jedoch keine Korrelationen zwischen der Dauer oder dem klinischen Verlauf der Erkrankung und den ST-Werten finden.

Unauffällige Werte fanden wir bei Patienten, die an amyotropher Lateralsklerose erkrankt waren (Tabelle 4, sowie Abbildungen 45 und 46).

Tabelle 4: Konzentrationen von Somatostatin im Liquor cerebrospinalis von neurologischen Patienten

	n	Alter (Jahre) $\bar{X} \pm \text{SEM}$	ST (pg/ml) $\bar{X} \pm \text{SEM}$
Kontrollgruppe (Alter < 50)	32	34 $\pm$ 2	150,2 $\pm$ 9,3
Kontrollgruppe (Alter > 50)	30	63 $\pm$ 2	143,3 $\pm$ 7,5
Chorea Huntington	29	42 $\pm$ 2	78,1 $\pm$ 10,4
Morbus Parkinson	18	64 $\pm$ 3	44,8 $\pm$ 7,1*
Morbus Wilson	2	28; 32	40,3; 28,5
Morbus Alzheimer	12	58 $\pm$ 4	51,5 $\pm$ 11,4*
Amyotrophe Lateralsklerose	8	57 $\pm$ 3	114,3 $\pm$ 18,1

X = Mittelwert; *: p < 0,005

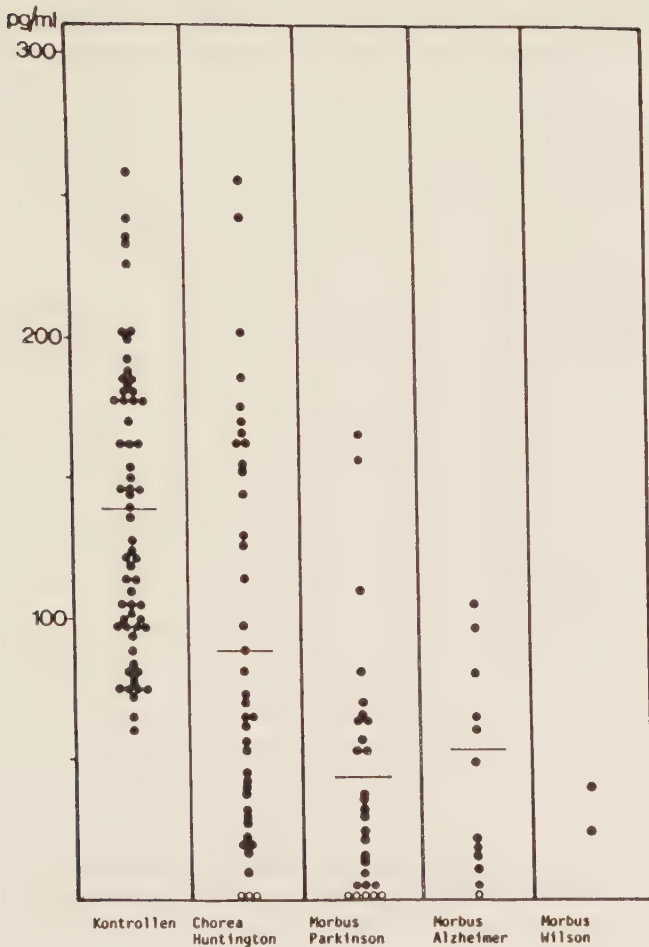


Abb. 45: Somatostatin im Liquor cerebrospinalis. Jeder Punkt symbolisiert einen Meßwert; Kreise bedeuten einen Wert unterhalb der Meßgrenze des Radioimmunoassay; der Querstrich zeigt den jeweiligen Mittelwert an.

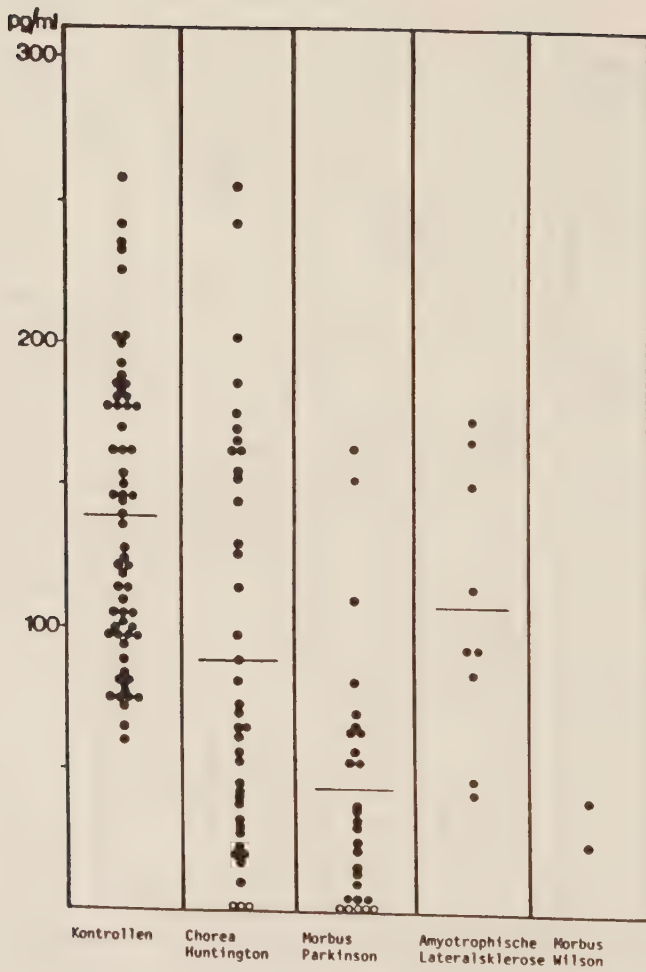


Abb. 46: Somatostatin im Liquor von neurologischen Patienten mit degenerativen ZNS-Erkrankungen, die mit Bewegungsstörungen einhergehen (Darstellung wie vorher).

Bei einer Gruppe von Patienten, die unter anhaltenden Schmerzen nach Ablauf eines Herpes zoster litten, fanden wir bei der Bestimmung von ST im Liquor stark erhöhte Werte, bei nachgewiesenen intakter Blut-Hirnschranke (getestet mittels Reiber-Schema). Die Werte lagen bei neun Patienten zwischen 280 und 790 pg/ml (vgl. Abb. 47).

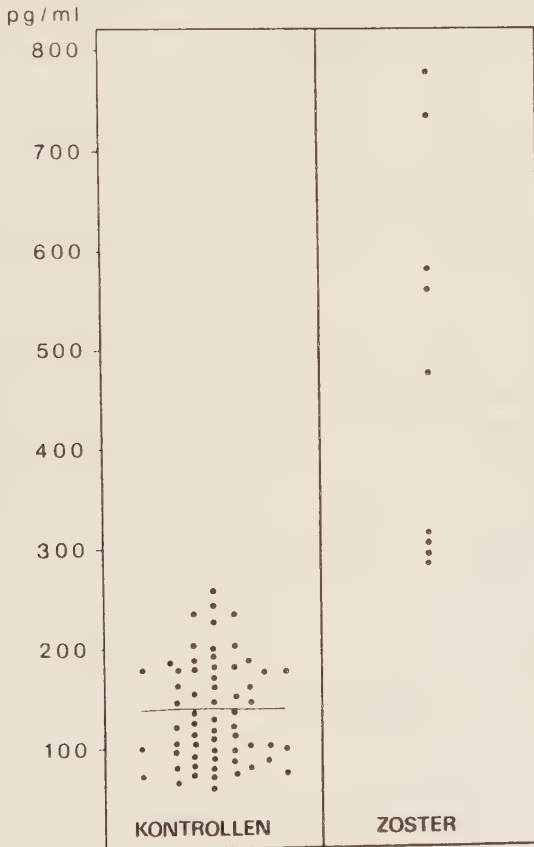


Abb. 47: ST-Konzentration im Liquor bei Kontrollpersonen und Patienten mit Zustand nach Zoster und anhaltenden postherpetischen Schmerzen.

Vasoaktives Intestinales Polypeptid

Die Kontrollwerte für VIP lagen bei $204,3 \pm 8,1$ pg/ml (Mittelwert $\pm$ SEM). Auch hier zeigten sich hinsichtlich Alters- und Geschlechtsverteilung keine Korrelationen.

Bei Morbus Parkinson, M. Wilson und Chorea Huntington waren keine signifikanten Unterschiede zu der Kontrollgruppe zu erkennen. Erniedrigte, jedoch mit der Kontrollgruppe überlappende Werte wurden beobachtet bei Patienten mit M. Alzheimer. Bei Multipler Sklerose zeigt sich ein Trend zu erniedrigten Werten, jedoch findet sich eine breite Streuung der einzelnen VIP-Konzentrationen im Liquor (Tabelle 5 und Abb. 48).

Tabelle 5: Konzentrationen von VIP im Liquor cerebrospinalis von neurologischen Patienten

	n	Alter (Jahre) $\bar{x} \pm \text{SEM}$	VIP (pg/ml) $\bar{x} \pm \text{SEM}$
Kontrollgruppe (Alter < 50)	35	34 ± 2	$208,3 \pm 11,9$
Kontrollgruppe (Alter > 50)	32	63 ± 2	$201,6 \pm 9,3$
Chorea Huntington	25	42 ± 2	$201,4 \pm 25,7$
Morbus Parkinson	12	61 ± 3	$183,8 \pm 29,6$
Morbus Wilson	2	$28; 32$	$230,0; 146,6$
Morbus Alzheimer	9	59 ± 4	$101,7 \pm 19,9^*$
Multiple Sklerose	14	47 ± 4	$145,5 \pm 31,0^{**}$

* : $p < 0,005$

** : $p < 0,01$



Abb. 48: VIP-Immunreaktivität im Liquor cerebrospinalis bei Kontrollpersonen und Patienten mit degenerativen Erkrankungen des Zentralnervensystems.

6. ST- und VIP-Konzentrationen in Hirnarealen eines Patienten mit Morbus Parkinson: Vergleich mit Kontrollpersonen

An dieser Stelle kann erst über vorläufige Befunde berichtet werden, die bei der Gewebsbestimmung von ST und VIP in Hirnregionen eines verstorbenen Patienten mit Morbus Parkinson erhoben wurden. Der Patient zeigte neben ausgeprägten motorischen Störungen (Rigor, Akinesie) zusätzlich bei der neuropsychologischen Testung eine deutliche Bradyphrenie.

Der makroskopisch erhobene pathologisch-anatomische Befund ergab keine auffälligen Veränderungen, insbesondere keine ausgeprägte corticale Atrophie.

Tabelle 6 zeigt einen Vergleich von ST- und VIP-Werten wichtiger Hirnareale bei Kontrollpersonen und dem Parkinsongehirn. Die Konzentrationen von VIP in Regionen des Parkinsongehirns (Cortex, Basalganglien, Thalamus und Hypothalamus) unterscheiden sich nicht signifikant von denen in entsprechenden Arealen von Normalpersonen. Dagegen fällt bei Somatostatin eine deutliche Erniedrigung der Werte in corticalen Arealen, vor allem im Cortex frontalis, temporalis und occipitalis auf, nicht jedoch im Nucleus caudatus, dem Putamen und dem Hypothalamus. Die ST-Konzentrationen im Cortex des Patienten sind zum Teil um mehr als zwei Drittel niedriger als in den Kontrollgeweben, was auch bei fehlender statistischer Absicherung - bei gut reproduzierbarer Meßmethode - für eine Echtheit der Befunde spricht.

Tabelle 6

Konzentration von Somatostatin- und VIP-IR in Hirnregionen von Kontrollpersonen und einem Patienten mit Morbus Parkinson.

Die Peptidkonzentrationen sind als ng/mg Protein ausgedrückt; die Anzahl der Kontrolluntersuchungen steht in Klammern angegeben.

HIRNREGION	SOMATOSTATIN		VIP	
	Kontrollen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	M. Parkinson	Kontrollen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	M. Parkinson
Cortex frontalis	1,72 $\pm$ 0,82 (4)	1,12	1,81 $\pm$ 0,17 (2)	1,42
Cortex centralis	1,61 $\pm$ 0,46 (4)	1,53	2,94 $\pm$ 0,40 (3)	2,76
Cortex temporalis	1,87 $\pm$ 0,32 (3)	0,58	3,59 $\pm$ 0,16 (2)	3,64
Cortex occipitalis	1,41 $\pm$ 0,28 (4)	0,23	3,83 $\pm$ 0,84 (3)	2,26
Nucleus caudatus	2,67 $\pm$ 1,02 (3)	2,31	0,95 $\pm$ 0,37 (2)	1,11
Putamen	1,50 $\pm$ 0,60 (3)	1,64	0,81 $\pm$ 0,07 (2)	1,09
Thalamus	1,46 $\pm$ 0,67 (3)	0,76	0,44 $\pm$ 0,14 (3)	0,61
Hypothalamus	18,32 $\pm$ 3,08 (3)	23,16	0,66 $\pm$ 0,11 (3)	0,82

Diskussion

Durch Immunisierung von Kaninchen konnten spezifische und hoch-affine Antiseren gegen ST und VIP gewonnen werden, die für immun-histochemische Untersuchungen und für die Entwicklung von Radio-immunoassays brauchbar waren. Die ST- und VIP-RIAs sind in ihrer Empfindlichkeit und Spezifität den in der Literatur angegebenen Assays (Arimura et al., 1975; Ebeid et al., 1976) vergleichbar. Unsere Ergebnisse zeigen die quantitative Verteilung von Somatostatlin im Gehirn der Ratte und des Menschen. Die Befunde an der Ratte, mit höchsten Konzentrationen im Hypothalamus (*Eminentia mediana*), Nucleus accumbens und Corpus amygdaloideum sind in Übereinstimmung mit Berichten von Brownstein et al. (1975) und Krohnheim et al. (1976).

Immunhistochemische Untersuchungen am Rattengehirn von Bennett-Clarke et al. (1980) und Weindl et al. (1984) ergaben eine gute Übereinstimmung mit den radioimmunologischen Ergebnissen. Am menschlichen ZNS wurde eine ausgedehnte Verbreitung von ST-Immunreaktivität mit Hilfe der radioimmunologischen Messungen an Gewebeproben und mittels Immunhistochemie nachgewiesen. Neben mediobasalen hypothalamischen Regionen mit einem hohen ST-Gehalt finden wir Somatostatlin auch außerhalb des Hypothalamus im Telencephalon, Mesencephalon, im Hirnstamm und im Rückenmark. Langevin und Emson (1982) wiesen ST-Immunreaktivität im Hypothalamus ebenfalls vor allem in rostralen und ventralen Anteilen radioimmunologisch nach. Große Mengen ST fanden sich im Corpus amygdaloideum, im Hippocampus und im Cortex cerebri. In den Basalganglien ist ST in hohen Gewebskonzentrationen im Nucleus caudatus und im Pallidum vorhanden. Die niedrigsten Werte sind in der weißen Substanz des Centrum semiovale und im Cerebellum nachweisbar. Insgesamt ist die Verteilung des Peptids vergleichbar mit derjenigen im Rattengehirn.

In diesem Zusammenhang ist die Tatsache wichtig, daß postmortal keine wesentliche Änderung in der Konzentration und der Gewebsverteilung von ST eintritt. Literaturberichte, bei denen der Einfluß von postmortaler Liegedauer und Temperatur auf die ST-Kon-

zentration im Hirngewebe der Ratte geprüft wurde, zeigten als Ergebnis keine Hinweise auf Peptidverluste durch proteolytischen Abbau bei Lagerung des Gewebes für die Dauer einiger Stunden bei Zimmer- oder Kühlraumtemperaturen (4°C). Tiefgefrorenes Gewebe zeigte auch nach langdauernder Aufbewahrung (Tage und Wochen) keinerlei Veränderungen im ST-Gehalt, ebenso war kein Unterschied zu erkennen zwischen einer Aufbewahrung für einige Stunden bei 4°C oder 20°C (Geola et al., 1981). Ähnliche Befunde werden auch von Bird (1981) berichtet, der bei Messungen von ST und Substanz P in menschlichen Gehirnen, die zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb von 24 Stunden postmortal entnommen wurden, keine Unterschiede in den Peptidkonzentrationen der einzelnen Gewebe feststellte.

Die radioimmunologisch gemessene ST-Verteilung im menschlichen Gehirn konnte immunhistochemisch weitgehend bestätigt werden. Im Hypothalamus wurde ST bei vielen Tierspezies in Neuronen und Fasern dargestellt, beispielsweise bei der Ratte (Hökfelt et al., 1975; Bennett-Clarke et al., 1980), im Meerschweinchen (Triepe et al., 1984), im Gehirn von Tupaia und der Katze (Weindl et al., 1984; Triepe et al., 1984), sowie bei Primaten (Filby und Gross, 1983). Wir fanden ST-Immunreaktivität im Hypothalamus in typischer Lokalisation periventrikulär und im Nucleus anterior hypothalami, sowie im Nucleus infundibularis und im Bereich des Infundibulums um die Portalgefäße. Epelbaum et al. (1984) zeigten im Tierversuch durch entsprechend gesetzte Läsionen, daß Fasern aus Neuronen des anterioren Hypothalamus zu den neurohämalen Zonen der circumventriculären Organe ziehen. Neurone aus diesen Gebieten projizieren auch zum Nucleus infundibularis und möglicherweise auch in extrahypothalamische Regionen (Kerne des Hirnstamms, Nucleus caudatus und Putamen; Kiemle und Mader, 1983). Darüberhinaus zeigt die vorliegende Untersuchung ST-immunreaktive Neurone und Fasern in vielen extrahypothalamischen Regionen. Im Cortex cerebri, wo zahlreiche einzeln gelagerte Nervenzellen in allen Schichten vorkommen, ist es denkbar, daß diese ein intrinsisches somatostatinergeres Interneuronensystem bilden, da die hier lokalisierten Fasern wenigstens im Tierversuch bei der Ratte

nicht mit hypothalamischen oder anderen ST-IR-Neuronen in Verbindung stehen (Epelbaum et al., 1984).

In den Basalganglien, besonders im Nucleus caudatus lassen sich zahlreiche ST-IR Perikaryen und Fasern darstellen. Möglicherweise bilden sie, wie die Neurone des Cortex, Interneurone eines intrinsischen somatostatinerger Systems. Eine Projektion in andere, extrastriatale Regionen konnte bisher nicht beobachtet werden. Daneben finden wir im Nucleus caudatus zahlreiche Fasern, deren Ursprung zum größten Teil im Striatum selbst liegt. Ob beim Menschen ein kleinerer Teil dieser Fasern aus extrastriatalen Regionen in den Nucleus caudatus projiziert, muß noch offen bleiben. Eine Projektion hypothalamischer Neurone in das Caudato-Putamen ist bei einigen Säugern (z. B. Ratte und Meerschweinchen) diskutiert worden (Epelbaum et al., 1984; Triepel et al., 1984; Weindl et al., 1984).

Die Befunde über die Verteilung von ST im menschlichen Gehirn entsprechen im wesentlichen der kürzlich erschienenen Beschreibung von Nieuwenhuys (1985).

Eine Bedeutung von ST als Neurotransmitter bei verschiedenen degenerativen Erkrankungen des ZNS ist verschiedentlich durch Liquor- und Gewebsuntersuchungen gezeigt worden. Unsere Ergebnisse bei der Messung von ST im Liquor zeigen bei bestimmten degenerativen ZNS-Erkrankungen charakteristische und konstante Verschiebungen der ST-Konzentrationen, im Vergleich zu Kontrollpersonen.

Die ST-Werte im Liquor von Kontrollpersonen dieser Untersuchung entsprechen der Mehrzahl anderer Literaturberichte (Cramer et al., 1981; Dupont et al., 1982; Hansen et al., 1981; Kohler et al., 1982). Einige Autoren geben etwas niedrigere Werte an (Beal und Martin, 1984; Patel et al., 1978; Wood et al., 1982).

Bei Morbus Alzheimer, wo corticale cholinerge Neurone zugrunde gehen (Sims et al., 1983), fanden wir erniedrigte ST-Werte im Liquor. Damit konform gehen Berichte, die einen Zelluntergang somatostatinerger Neurone bei seniler und präseniler Demenz vom Alzheimertyp aufzeigen (Joynt und McCeill, 1984). Im Cortex cerebri von Alzheimerpatienten wurde immunhistochemisch in den typi-

schen Plaques ST-Immunreaktivität nachgewiesen (Morrison et al., 1985). Eine gemeinsame Beeinträchtigung cholinерger und somatostatinerger Nervenzellen könnte zum Teil durch eine Koexistenz in ein und derselben Zelle erklärt werden.

Bei Gewebsbestimmungen von Somatostatin im Cortex von Alzheimerpatienten zeigte sich eine deutliche Erniedrigung der Peptidkonzentration, vor allem in frontalen und temporalen Anteilen, verglichen mit Normalpersonen (Rossor et al., 1982; Davies et al., 1982).

Bestimmungen von Somatostatin im Gehirn von Patienten mit Basalganglienerkrankungen wurden von verschiedenen Autoren berichtet. Epelbaum et al. (1983) beschreiben einen Verlust von ST im Cortex cerebri, vor allem in frontalen Teilen, bei Patienten mit Morbus Parkinson, wenn diese gleichzeitig eine Demenz aufwiesen. Bei denselben Patienten war der ST-Gehalt im Striatum im Vergleich zu Normalpersonen unverändert.

Bei bisher einem Gehirn eines Patienten mit M. Parkinson, der klinisch Zeichen einer Bradyphrenie zeigte, fanden wir in dieser Studie ein ähnliches Ergebnis mit erniedrigten ST-Konzentrationen im Cortex frontalis, Cortex temporalis und Cortex occipitalis, unveränderten Werten dagegen im Nucleus caudatus und im Putamen. Im Liquor war ST bei Patienten mit M. Parkinson hochsignifikant erniedrigt. Zwischen behandelten und unbehandelten Patienten war kein Unterschied in den ST-Liquorwerten zu erkennen.

Bei zwei Patienten mit Morbus Wilson (hepatolentikulärer Degeneration) fanden wir ebenfalls niedrige ST-Konzentrationen im Liquor. Die erniedrigten ST-Liquorwerte bei M. Parkinson wären nach den Befunden im Hirngewebe hauptsächlich als Folge eines corticalen Verlustes somatostatinerger Neurone zu interpretieren. Inwieweit bei pathologischen Prozessen innerhalb der Basalganglien eine Affektion der zahlreichen hier lokalisierten ST-Neurone vorliegt, ist noch offen und bedarf weiterer immunhistochemischer Untersuchungen.

Im Cortex von Parkinsonpatienten wird ein Verlust von Cholinacetyltransferase-Aktivität beobachtet (Ruberg et al., 1982), so daß

hier ein ähnlicher Befund vorliegt, wie in der Hirnrinde von Alzheimerpatienten (Rossor et al., 1982).

Bei einer anderen Erkrankung des Striatums, der autosomal dominant erblichen Chorea major Huntington wurde im Corpus striatum (Aronin et al., 1983; Nemeroff et al., 1983) und im Nucleus accumbens (Beal et al., 1984) eine erhöhte ST-Konzentration gefunden. Der gemessene erhöhte ST-Gehalt im Striatum ist wohl am ehesten als relativer Wert zu betrachten, der durch Aussparung der ST-immunreaktiven Neurone beim Zelluntergang vorgetäuscht wird. Da diese Zellen vom Untergang nicht betroffen sind, wird ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von NADPH-Diaphorase, einem Enzym aus der Gruppe der Dehydrogenasen, in den Neuronen und diesem Phänomen diskutiert (Emson et al., 1986). Auffallend ist, daß NADPH-Diaphorase-Aktivität im Nucleus caudatus und Putamen fast ausschließlich in Nervenzellen beobachtet wird, die sowohl ST-, als auch Neuropeptid Y-Immunreaktivität zeigen (Vincent et al., 1983). Insgesamt scheint es, daß somatostatinerge Neurone und Verbindungen in den Basalganglien nicht oder nur unwesentlich beeinträchtigt sind. Dieser Befund wäre vereinbar mit unserer Beobachtung eines unveränderten ST-Gehaltes im Liquor bei der überwiegenden Zahl der Patienten. Erniedrigte ST-Konzentrationen im Liquor von Huntington-Patienten, ähnlich wie bei einer Untergruppe unserer Patienten wurden von Cramer et al. (1981) berichtet. Möglicherweise besteht hier wiederum ein Zusammenhang zur fortschreitenden corticalen Atrophie und Demenz der Patienten. Somatostatin hemmt in vitro die dopaminabhängige Adenylatzyklase im Striatum (Chesselet und Reisine, 1983; Schröter und Cramer, 1980) und erhöht den Dopaminumsatz im Striatum (Beal und Martin, 1984). Von Cramer (1981) wurde vermutet, daß ein Mangel von ST zu einer Störung in nigrostriatalen, dopaminergen Bahnen führen könnte.

Bei amyotropher Lateralsklerose waren die ST-Werte im Liquor unverändert; dieser Befund kann damit erklärt werden, daß bei dieser motorischen Systemerkrankung ST-IR Neurone nicht bevorzugt beteiligt sind.

Ein interessanter Befund im Rahmen dieser Studie war die Tatsache, daß ST bei mehreren Patienten mit Post-Zosterneuralgie im Liquor um das zwei- bis fünffache erhöht vorkommt. Somatostatin konnte in großer Menge in Fasern in der Substantia gelatinosa im Hinterhorn des Rückenmarks gefunden werden. Eine mögliche Interpretation des erhöhten ST-Gehaltes im Liquor von Patienten mit Post-Zosterneuralgie wäre eine vermehrte Aktivität absteigender, somatostatinerger Neurone aufgrund des Ausfalls von Nervenzellen in den Spinalganglien, in welchen ebenfalls ST-IR nachgewiesen wurde (Hökfelt, 1975). Durch den Verlust solcher Neurone wäre eine vermehrte Freisetzung von ST aus absteigenden Nervenzellen denkbar.

Die immunhistochemische Darstellung von VIP im Rattengehirn zeigt das Vorkommen des Peptids vor allem im Neocortex, im Gegensatz zur Verteilung von anderen Neuropeptiden, wie Somatostatin, Substanz P, Neuropeptid Y und Enkephalinen, die hauptsächlich in subcorticalen Strukturen des Zentralnervensystems lokalisiert sind (Hökfelt et al., 1978). Unsere Befunde am Rattengehirn sind in Übereinstimmung mit Berichten von Fuxe et al. (1977) und Lorén et al. (1979). Die beobachteten corticalen VIPergen Neurone projizieren zum größten Teil intracortical und sind damit am ehesten Interneurone, jedoch gibt es Hinweise für subcorticale Projektionen, z. B. findet man VIP-IR Fasern, die durch die Capsula interna ziehen.

Im Cortex der Ratte ist eine Coexistenz von VIP und Cholinacetyltransferase in kleinen bipolaren Neuronen beschrieben (Eckenstein und Baughman, 1984). Ebenso finden sich in cholinergen Neuronen des Cortex beim Menschen in 20 bis 50 % gleichzeitig VIP-Immunreaktivität (Emson, 1985). In VIP-reichen Regionen des Rattengehirns wurde eine Stimulierbarkeit einer Adenylatzyklase durch VIP nachgewiesen, während eine VIP-abhängige Adenylatzyklase in VIP-armen Regionen, beispielsweise im Kleinhirn, fehlt (Quik et al., 1978; Kerwin et al., 1980). Durch dieses Enzymsystem könnte eine biologische Wirkung des Peptids vermittelt werden.

Die radioimmunologisch messbare Verteilung von VIP-IR im mensch-

lichen ZNS korreliert mit der immunhistochemisch darstellbaren Verteilung im Rattengehirn, sowie mit Literaturberichten (Emson et al., 1979), wobei die höchsten Konzentrationen des Peptids wieder im Cortex cerebri und im Corpus amygdaloideum zu finden waren.

Die Bestimmung von VIP im Liquor ergab messbare Werte, die mit Literaturberichten vergleichbar sind (Fahrenkrug et al., 1977). Im Neocortex nachgewiesene VIP-Neurone zeigen einen Synergismus mit Noradrenalin bei der Glykogenolyse (Magistretti und Schorret, 1984). Darüberhinaus wurde über eine Koexistenz von VIP mit Cholinacetyltransferase berichtet (Lundberg et al., 1979). Die Beobachtung eines Verlusts cholinergischer Projektionen im Neocortex bei Morbus Alzheimer (Perry et al., 1982) und die erniedrigten VIP-Werte bei einigen dieser Patienten könnten auf eine Affektion von corticalen VIP-Neuronen hinweisen. Emson (1985) berichtet über unauffällige Befunde bei der VIP-Bestimmung im Hirngewebe von Alzheimerpatienten, jedoch ist denkbar, daß die Umsatzrate ("Turnover") von VIP zu biologisch und immunologisch inaktiven Molekülen bei diesen Patienten gesteigert sein könnte.

Die unauffälligen VIP-Werte bei Patienten mit Basalganglienerkrankungen sind vereinbar mit dem Fehlen größerer Mengen dieses Neuropeptids in diesen Hirnarealen (Lorén et al., 1979; Sims et al., 1980). Bei dem einzigen Gehirn eines Parkinsonpatienten, das uns zur Verfügung stand, waren keine auffälligen Veränderungen bei der radioimmunologischen Bestimmung der VIP-Immunreaktivität festzustellen.

Bei Patienten mit Multipler Sklerose fanden wir bei Einigen sehr niedrige VIP-Konzentrationen im Liquor, jedoch zeigten die Werte aller untersuchten Patienten eine breite Streuung; die Abweichungen waren insgesamt nicht signifikant. Anderson et al. (1984) berichten über erniedrigte VIP-Werte im Liquor von M.S.-Patienten. Zu diskutieren wäre ein unspezifischer Verlust VIPerger Bahnen, der im Rahmen des disseminierten ZNS-Befalls auftritt, oder der Abbau von VIP ist bei dieser entzündlichen Erkrankung beschleunigt.

Mit Untersuchungen von Peptiden im Liquor cerebrospinalis haben wir versucht, am lebenden Patienten Änderungen von Konzentrationen zu erfassen und die Bedeutung dieser Transmitterstoffe für den Pathomechanismus bestimmter degenerativer ZNS-Erkrankungen zu beschreiben.

Liquoruntersuchungen stellen am Lebenden, neben "PET-Scan" (Positron Emission Tomography), eines der wenigen "diagnostischen Fenster" dar, die Einblick in den Stoffwechsel und in die Funktionsweise des Gehirns gewähren.

Die Ergebnisse unserer Liquoruntersuchungen wie auch die Gewebuntersuchungen anderer Autoren lassen den Schluß zu, daß Peptide als Neurotransmitter bei neurologischen Erkrankungen, insbesondere bei bestimmten Systemdegenerationen in ganz unterschiedlicher Weise betroffen sind. Durch Erstellen von "Patterns", d.h. Peptidmuster oder "Mosaiken" aus möglichst vielen Neuropeptiden bei ZNS-Erkrankungen lassen sich möglicherweise diagnostische Hilfen, sowie ein weiteres Verständnis für die Pathomechanismen von ZNS-Störungen ableiten. Peptide lassen sich auch als Stoffe charakterisieren, die bei ZNS-Erkrankungen als "neuronale Marker" fungieren können.

Ein weiterführender Gedanke ist, eine Substitution der Peptide, ähnlich wie beispielsweise L-DOPA bei M. Parkinson zu versuchen. Im Augenblick scheitert dies jedoch bereits an der Undurchlässigkeit der Bluthirnschranke für Peptide. Als zukünftige Möglichkeit zur Umgehung dieser Schwierigkeit könnten stabile liquorgängige Analoge mit einer lipophilen Gruppe eingesetzt werden (sog. Latentiation), oder es wird versucht durch direktes Einbringen der Neuropeptide intrathekal in den Liquorraum eine Wirkung auf das ZNS zu erzielen, wie dies beispielsweise bei der intraspinalen Opiatanalgesie durchgeführt wird.

Zusammenfassung

Die Verteilung von Somatostatin (ST) und Vasoaktivem Intestinalem Polypeptid (VIP) wurde im Gehirn der Ratte und des Menschen mit spezifischen Antiseren radioimmunologisch und immunhistochemisch untersucht. Dazu wurden empfindliche RIAs für die Peptide entwickelt, mit denen der Nachweis von Somatostatin und Vasoaktivem Intestinalem Polypeptid im Hirngewebe und im Liquor cerebrospinalis möglich ist. Beide Neuropeptide kommen weitverbreitet im gesamten Zentralnervensystem vor, wobei ST besonders stark im Hypothalamus und in den Basalganglien vorkommt, während VIP vor allem im Cortex cerebri nachweisbar ist.

Darüberhinaus erfolgte die Bestimmung von ST und VIP im Liquor cerebrospinalis von Kontrollpersonen und von Patienten mit degenerativen Erkrankungen des Zentralnervensystems. Somatostatin wurde erniedrigt gefunden bei Morbus Parkinson, M. Wilson und seniler Demenz vom Alzheimer-Typ. ST war erhöht bei Patienten mit Post-Zosterneuralgie.

VIP war bei einigen Patienten mit M. Alzheimer erniedrigt, während bei Patienten mit Basalganglienerkrankungen keine auffälligen Liquorbefunde zu erkennen waren.

Literaturverzeichnis

- Abe H, Molitch ME, Van Wyk JJ, Underwood LE (1973) Human growth hormone in unanesthetized rats. *Endocrinology* 113: 1319 - 24
- Alberti KGMM, Christensen SE, Iverson I, Seyer-Hansen K, Christensen NJ, Prange Hansen A, Lundbaek K, Orskov H (1973) Inhibition of insulin secretion by somatostatin. *Lancet* II: 1299
- Alpert LC, Brawer JR, Patel YC and Reichlin S (1976) Somatostatinergic neurons in anterior hypothalamus: immunohistochemical localization. *Endocrinology* 98: 255 - 8
- Anderson O, Fahrenkrug J, Wikkelsø C, Johansson BB (1984) VIP in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Peptides* 5: 435 - 7
- Arimura A, Sato H, Coy DH, Schally A (1975) Radioimmunoassay for growth-hormone release inhibiting hormone. *Proc Soc Exp Biol Med* 148: 784 - 9
- Arimura A, Smith W, Schally A (1976) Blockade of stress-induced decrease in blood GH by anti-somatostatin serum in rats. *Endocrinology* 98: 540 - 3
- Arnold AM, Reppert SM, Rorstad OP, Sagar M, Keutman HT, Perlow MJ, Martin JB (1982) Temporal patterns of somatostatin immunoreactivity in the cerebrospinal fluid of the rhesus monkey: effect of environmental lighting. *J Neurosci* 2: 674 - 80
- Aronin N, Cooper PE, Lorenz LJ, Bird ED, Sagar SM, Leeman S, Martin JB (1983) Somatostatin is increased in the basal ganglia in Huntington's disease. *Ann Neurol* 13: 519 - 26
- Bakhit C, Benoit R, Bloom FE (1983) Release of somatostatin-28 (1 - 12) from rat hypothalamus in vitro. *Nature* 301: 524 - 6
- Beal MF, Domesick VB, Martin JB (1983) Regional somatostatin distribution in the rat striatum. *Brain Res* 278: 103 - 8
- Beal MF, Bird ED, Longlais PJ (1984) Somatostatin is increased in the nucleus accumbens in Huntington's disease. *Neurology* 34: 663 - 6
- Beal MF, Martin JB (1984) CSF somatostatin in dementia. *Neurology* 34 (Suppl 1): 120
- Beal MF, Martin JB (1984) Effects of somatostatin on striatal do-

- pamine. *Neurology* 34 (Suppl 1): 98
- Bennett GW, Edwardson JA, Holland D, Jeffcoat SL, White N (1975) Release of immunoreactive luteinizing hormone releasing hormone and thyrotropin releasing hormone from hypothalamic synaptosomes. *Nature* 257: 323 - 5
- Bennett-Clarke C, Romagnano MA, Joseph SA (1980) Distribution of somatostatin in the rat brain: Telencephalon and Diencephalon. *Brain Res* 188: 473 - 86
- Berelowitz M, Krohnheim S, Pimstone B, Sheppard M (1981) Potassium stimulated calcium dependent release of immunoreactive somatostatin from incubated rat hypothalamus. *J Neurochem* 31: 1537 - 9
- Berelowitz M, Firestone SL, Frohman LA (1981) Effects of growth hormone excess and deficiency on hypothalamic somatostatin content an release and on tissue somatostatin distribution. *Endocrinology* 109: 714 - 9
- Berelowitz M, LeRoith D, von Schenk et al. (1982) Somatostatin-like immunoreactivity and biological activity is present in *Tetrahymena pyriformis*, a ciliated protozoon. *Endocrinology* 110: 1339 - 44
- Bird ED (1981) Problems of peptide analysis in human post-mortem brain. In: *Neurosecretion and brain peptides*. ed by JB Martin, S Reichlin and KL Blick, Raven Press, NY: 657 - 72
- Bläher S, Vigh-Teichman J, Ueck M (1982) Cerebrospinal fluid contacting neurons and other somatostatin-immunoreactive perikarya in brains of tadpoles of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res* 221: 693 - 7
- Bliss TVP, Lomo T (1973) Long-acting potentiation of synaptic transmission. *J Physiol (London)* 232: 331
- Bloom SR, Mortimer CH, Thorner MO, Besser GM, Hall R, Gomez-Pan A, Roy VM, Russel RCG, Coy DH, Kastin AJ, Schally AV (1974) Inhibition of gastrin and gastric acid secretion by growth hormone-release inhibiting hormone. *Lancet* II: 1106
- Bodanszky M, Klausner YS, Lin CY, Mutt V, Said SJ (1974) Synthesis of vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *J Am chem Soc* 96: 4973 - 8

- Borghgi C, Nicosia S, Giachetti A, Said SH (1979) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) stimulates adenylatcyclase in selected areas of rat brain. *Life Sci* 24: 65 - 70
- Brazeau M, Spiess J, Reubi JC, Perrin M, Vale W (1981) Somatostatin-28 (SS-28), somatostatin-14 (SS-14) and their analogs: comparative biologic actions. Presented at the 63rd annual meeting of the Endocrine Society, Cincinnati, June 17 - 19
- Brown MR (1981) Somatostatin-28, somatostatin-14 and somatostatin analogs: effect on thermoregulation. *Brain Res* 214: 125 - 35
- Brownstein MJ, Arimura A, Sato H, Schally AV, Kizer JS (1975) The regional distribution of somatostatin in the rat brain. *Endocrinology* 96: 1456 - 61
- Brownstein MJ (1978) Are hypothalamic hormones central neurotransmitter? In: Centrally acting peptides, edited by J Hughes, The Macmillan Press Ltd, London: 37 - 47
- Bryant MG, Bloom SR, Polak JM, Albuquerque RH, Modlin J, Pearse AGE (1976) Possible dual role for vasoactive intestinal peptide as a gastrointestinal hormone and neurotransmitter substance. *Lancet* 1: 991 - 3
- Buffa R, Capella C, Solcia E, Frigerio B, Said SJ (1977) Vasoactive intestinal peptide (VIP) cells in the pancreas and gastrointestinal mucosa. *Histochemistry* 50: 217 - 27
- Card JP, Brecha N, Karten HJ, Moore RY (1981) Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells nad processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *J Neurosci* 1: 1289 - 1303
- Chesselet MF, Reisine TD (1983) Somatostatin regulates dopamine release in rat slices and cat caudate nuclei. *J Neurosci* 3: 232 - 6
- Chihara K, Minamitani N, Kaji H, Arimura A, Fujita T (1981) Intraventricularly injected growth hormone stimulates somatostatin release into rat hypophyseal portal blood. *Endocrinology* 109: 2279 - 81
- Chihara K, Arimura A, Chihara M, Schally AV (1978) Studies on the mechanism of growth hormone and thyreotropin responses to soma-

- tostatin antiserum in anesthetized rats. *Endocrinology* 103: 1916 - 23
- Cramer H, Kohler J, Oepen G, Schomburg G, Schröter E (1981) Huntington's chorea - measurements of somatostatin, substance P and cyclic nucleotides in the cerebrospinal fluid. *J Neurol* 225: 183 - 7
- Creutzfeld W, Lankisch PG, Fölsch UR (1975) Hemmung der Sekretin- und Cholezystokinin-Pankreozymin-induzierten Saft- und Enzymsekretion beim Menschen durch Somatostatin. *Dtsch med Wschr* 100: 1135
- Davies P, Katz DA, Crystal HA (1982) Choline acetyltransferase, somatostatin and substance P in selected cases of Alzheimer's Disease. In S Corkin et al. (Eds), *Alzheimer's Disease: a Report of Progress*, Raven Press, New York: 9 - 14
- Deschodt-Lankman M, Robberecht P, Christophe J (1977) Characterization of VIP sensitive adenylatcyclase in guinea-pig brain. *FEBS Lett* 83: 76 -80
- Dichter MA, Delfs JR (1981) Somatostatin and cortical neurons in cell culture. *Adv Biochem Psychopharmacol* 28: 145 - 57
- Dierickx K and Vandesande F (1979) Immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res* 201: 349 - 59
- Dupont E, Christensen SE, Hansen AP, de Fine Olivarius B, Orskov H (1982) Low cerebrospinal fluid somatostatin in Parkinson's disease: an irreversible abnormality. *Neurology (NY)* 32: 312 - 14
- Ebeid AM, Murray P, Hirsch H, Wesdorp RIC, Fischer JE (1976) Radio-immunoassay of vasoactive intestinal peptide. *J Surg Res* 20: 355 - 60
- Eckenstein F, Baughman RW (1984) Two types of cholinergic innervation in cortex, one colocalized with vasoactive intestinal polypeptide. *Nature* 309: 153 - 5
- Edvinsson L, Fahrenkrug J, Hanko J, McCulloch J, Owman C, Uddman R (1981) Vasoactive intestinal polypeptide: distribution and effects on cerebral blood flow and metabolism. In: *Cerebral microcirculation and metabolism*, edited by J Cervos-Navarro and E Fritschka, Raven Press, New York

- Efendic S, Luft R (1975) Studies on the mechanism of somatostatin action on insulin secretion in man. *Acta Endocr* 78: 516
- Emsen PC, Fahrenkrug J, Schaffalitzky de Muckadell OB, Jessel TM, Iversen LL (1978) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP): vesicular localization and potassium evoked release from rat hypothalamus. *Brain Res* 143: 174 - 8
- Emsen PC, Fahrenkrug J, Spokes EG (1979) Human brain vasoactive intestinal polypeptide (VIP): Distribution in controls and Huntington's chorea. *Brain Res*
- Emsen PC (1985) persönliche Mitteilung
- Emsen PC, Dawbarn D, De Quid ME (1986) CNS-peptides in Huntington's chorea. *Proc Int Symp on Sensory Motor Integration, implications for neurological diseases*. Springer, Heidelberg, New York, (in press)
- Epelbaum J, Arancibia LT, Kordon C, Otterson OP, Ben-Ari Y (1979) Regional distribution of somatostatin within the amygdaloid complex of the rat brain. *Brain Res* 174: 1 - 3
- Epelbaum J, Ruberg M, Moyse E, Javoy-Agid F, Dubois B, Agid Y (1983) Somatostatin and dementia in Parkinson's disease. *Brain Res* 278: 376 - 9
- Epelbaum J, Tapia-Arancibia L, Herman JP, Kordon C, Palkovits M (1984) Multiple projections of hypothalamic containing neurons in the rat brain. In: *2nd International Symposium on Somatostatin*, Athen: 43 - 7
- Fahrenkrug J, Schaffalitzky de Muckadell OB (1976) Radioimmunoassay of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in plasma. *J Lab Clin Med* 89: 1379 - 87
- Fahrenkrug J, Schaffalitzky de Muckadelle OB, Fahrenkrug A (1977) Vasoactive intestinal polypeptide in human cerebrospinal fluid. *Brain Res* 124: 581 - 4
- Fahrenkrug J, Haglund U, Jodal M, Lundgren O, Olbe L, Schaffalitzky de Muckadell OB (1978) Nervous release of vasoactive intestinal polypeptide in the gastrointestinal tract of cats: possible physiological implications. *J Physiol (London)* 284: 291 - 305
- Fahrenkrug J (1979) Vasoactive intestinal polypeptide: Measurement, distribution and putative neurotransmitter function. *Digestion*

19: 149 - 69

- Fehm HL, Voigt KH, Lang R, Beinert KE, Raptis S, Pfeiffer EF (1976) Somatostatin: a potent inhibitor of ACTH-hypersecretion in adrenal insufficiency. *Klin Wschr* 54: 173 - 5
- Filby Ab, Gross DS (1983) Distribution of immunoreactive somatostatin in the primate hypothalamus. *Cell Tissue Res* 133: 69 -80
- Forssmann WG (1978) A new somatostatinergetic sytem in the mammalian spinal cord. *Neurosci Lett* 10: 293 - 7
- Forssmann WG, Burnweit C, Shehab T, Triefel J (1979) Somatostatin-immunoreactive nerve cell bodies and fibers in the medulla oblongata et spinalis. *J Histochem Cytochem* 27: 1391 - 3
- Fuxe K, Hökfelt T, Said SJ, Mutt V (1977) Vasoactive intestinal polypeptide and the nervous system: immunohistochemical evidence for localization in central and peripheral neurons, particularly intracortical neurons of the cerebral cortex. *Neurosci Lett* 5: 241 - 5
- Gaginella TS, Mekjian HS, O'Dorisio Tm (1978) Vasoactive intestinal peptide: quantification by radioimmunoassay in isolated cells, mucosa and muscle of the hamster intestine. *Gastroenterology* 74: 718 - 21
- Geola FL, Yamada T, Warwick RJ, Tourtelotte WW, Hershman JM (1981) Regional distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the human brain. *Brain Res* 229: 35 - 42
- Gerich JE (1981) Somatostatin. In: Brownlee M (Ed) *Handbook of diabetes mellitus*, Vol 1, Garland STRM Press, New York: 297- 354
- Giachetti A, Said SJ, Reynolds RC, Koniges FC (1977) Vasoactive intestinal polypeptide in brain: Localization in and release from isolated nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3424 - 7
- Girod C, Dubois MP, Durand N (1980) Immunocytochemical evidence for the presence of somatostatin-like immunoreactivity in scattered cells of the duct system of the submandibular glands in the monkey, *Macacca irus*. *Histochemistry* 69: 137 - 43
- Graybiel AM, Ragsdale CW, Yoneoka ES, Elde RP (1981) An immunohistochemical study of enkephalins and other neuropeptides in the striatum of the cat with evidence that the opiate peptides are arranged to form mosaic patterns in register with the striosomal

- compartments visible acetylcholine-esterase staining. *Neurosci* 6: 377 - 97
- Hall R, Schally AV, Evered D, Kastin AJ, Mortimer C, Tunbridge WGM, Besser GM, Coy DH, Goldie DJ, McNeilly AS, Phenekos C, Wheightman D (1973) Action of growth-hormone release-inhibiting hormone in healthy men and in acromegaly. *Lancet* II: 581 - 4
- Hansen AB, de Fine Olivarius SE, Pederson E, Sorensen K, Dupont E, Ingenslec J, Christensen SE, Orskov H (1981) Cerebrospinal fluid SLI: On its origin and pathology in neurological disease. In: Rosenthal J (Ed) *Proceedings of the 2nd symposium on Somatostatin*, Athens 1981, University Press, Tübingen
- Hellman B, Lernmark A (1969) Inhibition of the in vitro secretion of insulin by an extract of pancreatic cells. *Endocrinology* 84: 1484 - 7
- Hobart P, Crawford R, Shen L, Pictet R, Rutter WJ (1980) Cloning and sequence analysis of cDNA encoding two distinct somatostatin precursors found in the endocrine pancreas of anglerfish. *Nature* 288: 137 - 41
- Höfken B, Lucke C (1975) Effect of somatostatin on pituitary hormone secretion. *Acta Endocr (Kbh) Suppl* 193: 70
- Hökfelt T, Efendic S, Hellerström C, Johansson O, Luft R, Arimura A (1975) Cellular localization of somatostatin in endocrine-like cells and neurons of the rat with special references to the A1-cells of the pancreatic islets and to the hypothalamus. *Acta Endocr* 80, Suppl 200: 5 - 41
- Hökfelt T, Elvin LG, Elde R, Schultzberg M, Goldstein M, Luft R (1977) Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in some peripheral sympathetic noradrenergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3587 - 91
- Hökfelt T, Elde R, Fuxe K, Johansson O, Ljungdahl A, Goldstein M, Luft R, Efendic S, Nilsson G, Terenius L, Ganten D, Jeffcoate S, Rehfeld J, Said S, Perez de la Mora M, Posani L, Tapia R, Teran L, Palacios R (1978) Aminergic and peptidergic pathways in the nervous system with special reference to the hypothalamus. In: Reichlin S, Baldessarini RJ, Martin JB (Eds), *Hypothalamus*, Raven Press, New York: 69 - 135

- Hökfelt T, Johansson O, Ljungdahl A, Lundberg JM, Schultzberg M (1980) Peptidergic neurons. *Nature* 284: 515 - 21
- Hökfelt T, Johansson O, Goldstein M (1984) Chemical anatomy of the brain. *Science* 225: 1326 - 34
- Jackson IMD (1978) Phylogenetic distribution and function of the hypophyseotropic hormones of the hypothalamus. *Am Zoologist* 18: 385 - 99
- Johnson DG, Ensick JW, Koerker D, Palmer J, Goodner CJ (1975) Inhibition of glucagon and insulin secretion by somatostatin in rat pancreas perfused in situ. *Endocrinology* 96: 370
- Joynt RJ, McNeill TH (1984) Disease correlated morphologic changes of somatostatin-like-immunoreactivity containing neurons of the cortex in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurology* 4 (Suppl 1). 120
- Kachelhoffer J, Marescaux J, Michel F, Grenier JF (1979) Le peptide intestinal vasoactif (VIP). *Gastroenterol Clin Biol* 3: 381 - 96
- Kachelhoffer J, Eloy MR, Pousse A, Hohmattar D and Grenier J (1974) Mesenteric vasomotor effects of vasoactive intestinal polypeptide: study on perfused isolated canine jejunal loops. *Pflügers Arch* 352: 37 - 46
- Kerwin RW, Pay S, Bhoola KD, Pycock CJ (1980) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)- sensitive adenylat cyclase in rat brain: regional distribution and localization in hypothalamic neurons. *J Pharmacol* 32: 561 - 6
- Kiemle J, Mader J, (1983) Somatostatin im Zentralnervensystem des Meerschweinchen; eine Mappingstudie. Dissertationsschrift, Medizinische Fakultät der Rupprecht-Karl-Universität, Heidelberg
- Köhler J, Schröter E, Cramer H (1982) Somatostatin-like immunoreactivity in the cerebrospinal fluid of neurological patients. *Arch Psychiatr Nervenkr* 231: 503 - 8
- König JFR and Klippel RA (1963) The Rat Brain: A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. Williams and Wilkins, Baltimore
- Konturek SJ, Tasler J, Jaworek et al. (1981) Gastrointestinal secretory, motor, circulatory and metabolic effects of prosomatostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 1976 - 81

- Krieger B (1983) Brain peptides: what, where and why? *Science* 222: 975 - 85
- Krisch B (1981) Somatostatin-immunoreactive fiber projections into the brain stem and spinal cord of the rat. *Cell Tissue Res* 217: 531 - 52
- Krohnheim S, Berelowitz M, Pimstone BL (1976) A radioimmunoassay for growth hormone release-inhibiting hormone: Method and quantitative tissue distribution. *Clin Endocrinol*: 619 - 30
- Krulich L, Dhariwal APS, McCann SM (1968) Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth-hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology* 83: 783 - 90
- Langevin H, Emson PC (1982) Distribution of substance P, somatostatin and neurotensin in the human hypothalamus. *Brain Res* 246: 65 - 9
- Larsson LJ, Edvinsson L, Fahrenkrug J, Hakanson R, Owman CH, Schaffalitzky de Muckadell OB, Sundler F (1976) Immunohistochemical localization of a vasodilatory polypeptide (VIP) in cerebrovascular nerves. *Brain Res* 113: 400 - 4
- Larsson LJ, Fahrenkrug J, Schaffalitzky de Muckadell OB, Sundler F, Hakanson R and Rehfeld JF (1976) Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 3197 - 200
- Larsson LJ, Fahrenkrug J, Hobst JJ, Schaffalitzky de Muckadell OB (1978) Innervation of the pancreas by vasoactive intestinal polypeptide (VIP) immunoreactive nerves. *Life Sci* 22: 773 - 80
- Larsson LJ (1980) Gastrointestinal cells producing endocrine, neurocrine and paracrine messengers. *Clin Gastroenterol* 9: 485 - 516
- Lindkaer Jensen S, Fahrenkrug J, Hobst JJ, Van Nielson O, Schaffalitzky de Muckadell OB (1978) Secretory effects of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on the isolated perfused porcine pancreas. *Am J Physiol* 235: E 387 - E 391
- Lindvall M, Alumets J, Edvinsson L, Fahrenkrug J, Hakanson R, Hanko J, Schaffalitzky de Muckadell OB, Sundler F (1978) Peptidergic (VIP) neurons in the mammalian choroid plexus. *Neurosci Lett* 9: 77 - 82
- Lorén J, Emson PC, Fahrenkrug J, Björklund A, Alumets J, Hakanson R, Sundler F (1979) Distribution of vasoactive intestinal

- polypeptide in the rat and mouse brain. *Neurosci* 4: 1953 - 76
- Lowry HO, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 53: 265 - 75
- Lundberg JM, Hökfelt T, Nilsson G et al. (1978) Peptide neurons in the vagus, splanchnic and sciatic nerves. *Acta Physiol Scand* 104: 499 - 501
- Lundberg JM, Hökfelt T, Schultzberg M, Uvnäs-Wallenstein K, Kohler C, Said SJ (1979). Occurrence of vasoactive intestinale polypeptide (VIP)- like immunoreactivity in certain cholinergic neurons of the cat: Evidence from combined immunohistochemistry and acetylcholinesterase staining. *Neurosci* 4: 1539 - 59
- Magistretti PJ and Schorderet M (1984) VIP and noradrenaline act synergistically to increase cyclic AMP in cerebral cortex. *Nature* 308: 280 - 2
- Mandarino L, Stenner D, Blanchard W et al (1981) Selective effects of somatostatin-14, -25 and -28 on in vitro insulin and glucagon secretion. *Nature* 291: 67 - 7
- Marks N (1976) Subcellular mechanisms in reproductive neuroendocrinology. Naftolin F, Ryan KJ and Davies IJ (Eds), Elsevier, New York: 129 - 47
- Martin JB, Brazeau P, Tannenbaum GS et al. (1978) Neuroendocrine organization of growth hormone regulation. In: Reichlin S, Balleddarini RJ, Martin JB (Eds) *The hypothalamus*. Raven Press, New York: 329 - 51
- Morrison JH, Rogers J, Scherr S, Benoit R, Bloom FE (1985) Somatostatin-immunoreactivity in neuritic plaques of Alzheimer's patients. *Nature* 314: 61 - 3
- Molnar J, Arimura A, Kastin AJ (1976) Presence of immunoreactive somatostatin in the salivary gland and saliva. *Fed Proc* 35: 782 (abstract)
- Mutt V and Said SJ (1974) Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptids. The aminoacid sequence. Use of kallikrein in its determination. *Eur J Biochem* 42: 581 - 9
- Nemeroff CB, Youngblood WW, Manberg PJ, Prange AJ (1983) Regional brain concentrations of neuropeptides in Huntington's chorea and schizophrenia. *Science* 221: 972 - 5

- Nilsson A (1974) Isolation, amino acid composition and terminal amino acid residues of the vasoactive octacosapeptide from chicken secretin. Partial purification of chicken secretin. FEBS Lett 47: 284 - 9
- Nilsson A (1975) Structure of the vasoactive intestinal octacosapeptide from chicken intestine. The amino acid sequence. FEBS Lett 60: 322 - 6
- Nieuwenhuys R (1985) Chemoarchitecture of the brain. Springer, Heidelberg, New York
- Oertel WM, Graybiel AM, Mugnaini E, Elde RP, Schmechel DE, Kopin IJ (1983) Coexistence of glutamic acid decarboxylase and somatostatin-like immunoreactivity in neurons of the feline nucleus reticularis thalami. J Neurosci 3: 1322
- Palkovits M (1973) Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. Brain Res 59: 449 - 59
- Palkovits M and Jacobowitz DM (1974) Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase-containing neurons in the rat brain - Hindbrain (mesencephalon, rhombencephalon). J Comp Neurol 157: 29 - 42
- Patel YC and Reichlin S (1978) Somatostatin in hypothalamus, extra-hypothalamic brain and peripheral tissues of the rat. Endocrinology 102: 523 - 30
- Pearse AGE (1974) The gut as an endocrine organ. Br J Hosp Med 11: 697 - 707
- Perry RH, Candy JM, Perry EK, Irving D, Blessed G, Fairbairn AF, Tomlinson BE (1982) Extensive loss of cholinacetyltransferase activity is not reflected by neuronal loss in the nucleus of Meynert in Alzheimer's disease. Neurosci Lett 33: 311 - 15
- Phillis JW (1966) The pharmacology of synapses. Pergamon Press, Oxford: 6 - 7
- Phillis JW, Kirkpatrick JR and Said SJ (1978) Vasoactive intestinal polypeptide excitation of central neurons. Can J Physiol Pharmacol 56: 337 - 40
- Piper PJ, Said SJ, Vane JR (1970) Effects on smooth muscle preparations of unidentified vasoactive peptides from intestine and lung. Nature (Lond) 225: 1144 - 6

- Polak J, Pearse AGE et al (1975) Growth hormone-release inhibiting hormone in gastrointestinal and pancreatic D-cells. *Lancet* 1: 1220 - 2
- Polak J, Pearse AGE, Garand JC and Bloom SR (1974) Cellular localization of a vasoactive intestinal peptide in the mammalian and avian gastrointestinal tract. *Gut* 15: 720 - 4
- Quirk M, Iversen LL, Bloom SR (1978) Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and other peptides on cAMP accumulation in rat brain. *Biochem Pharmacol* 27: 2209 - 13
- Quirk M, Emson PC, Fahrenkrug J and Iversen LL (1979) Effect of kainic acid injections and other brain lesions on vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-stimulated formation of cyclic adenosine monophosphate in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 306: 281 - 6
- Randic M, Miletic V (1978) Depressant actions of methionine-enkephalin and somatostatin in cat dorsal neurons of noxious stimulus. *Brain Res* 152: 196 - 202
- Raptis S, Thum C, Berger LV, Schröder KE, Meissner C, Schlegel W (1975) Inhibition of gastrin secretion by somatostatin. *Acta Endocr (Kbh) Suppl* 93: 74
- Raptis S, Schlegel W, Pfeiffer EE (1978) Effects of somatostatin on gut and pancreas. In: Bloom SR (Ed) *Gut hormones*, Churchill Livingstone, Edinburgh: 446 - 52
- Rasool CG, Schwartz AL, Bollinger JA, Reichlin S, Bradley WG (1981) Immunoreactive somatostatin distribution and axoplasmatic transport in rat peripheral nerve. *Endocrinology* 108: 996 - 1001
- Renaud LP and Padjen A (1978) Electrophysiological analysis of peptide actions in neural tissue. In: Hughes J (Ed) *Centrally acting peptides*, The Macmillan Press Ltd, London: 59 - 84
- Reubi JC, Perrin MH, Rivier JE, Vale W (1981) High affinity binding sites for a somatostatin-28 analog in rat brain. *Life Sci* 28: 2191 - 8
- Richardson S, Hollander CS, D'Eletto R, Greenleaf PW, Thaw C (1980) Acetylcholine inhibits the release of somatostatin from rat hypothalamus in vitro. *Endocrinology* 107: 122 - 9
- Rorstad OP, Brownstein MJ, Martin JB (1979) Immunoreactive and

- biologically active somatostatin-like material in rat retina.
Proc Natl Acad Sci USA 76: 3019 - 23
- Rorstad OP, Epelbaum J, Brazeau P, Martin JB (1979) Chromatographic and biological properties of immunoreactive somatostatin in hypothalamic and extrahypothalamic brain regions of the rat. *Endocrinology* 105: 1083 - 92
- Rossor MN, Garrett NJ, Johnson AJ, Mountjoy CQ, Roth M, Iversen LL (1982) A post-mortem study of the cholinergic and GABA systems in senile dementia. *Brain* 105: 313 - 30
- Roth J, LeRoith D, Shiloh J, Rosenzweig JL, Lesmiak MA, Havrankova J (1982) The evolutionary origins of hormones, neurotransmitters and other extracellular chemical messengers: implications for mammalian biology. *N Engl J Med* 306: 523 - 7
- Ruberg M, Ploska A, Javoy-Agid F, Agid Y (1982) Muscarinic binding and choline acetyltransferase activity in Parkinsonian subjects with reference to dementia. *Brain Res* 232: 129 - 39
- Said SJ, Mutt V (1970) Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*, NY 169: 1217 - 8
- Said SJ and Mutt V (1970) Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut. *Nature (Lond)* 225: 863 - 4
- Said SJ and Faloon GR (1975) Elevated plasma and tissue levels of vasoactive intestinal polypeptide in the watery-diarrhea syndrome due to pancreatic, bronchiogenic and other tumors. *New Engl J Med* 293: 155 - 60
- Said SJ and Rosenberg RN (1976) Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue. *Science* NY 192: 907 - 8
- Schröter E, Cramer H (1980) Wirkung der Neuromodulatoren Adenosin, Substanz P und Somatostatin auf die dopaminsensitive Adenylatzyklase im Corpus striatum der Ratte. In: Mertens HG, Przuntek H (Hrsg) *Pathologische Erregbarkeit des Nervensystems und ihre Behandlung*. Springer, Berlin: 502 - 5
- Schusdziarra V, Rouiller D, Unger RM (1979) Oral administration of somatostatin reduces postprandial plasma triglycerides, gastrin and gut glucagon-like immunoreactivity. *Life Sci* 24: 1595 - 600
- Shen L-P, Pictet RL, Rutter WJ (1982) Human somatostatin I:

- sequence of the cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4575 - 9
- Sheppard MC, Bohnheim S, Pimstone BL (1978) Stimulation by growth hormone of somatostatin release from rat hypothalamus in vitro. *Clin Endocrinol (Oxford)* 9: 583 - 6
- Shields D, Warren TG, Green RF, Roth SE, Brenner MJ (1981) The primary events in the biosynthesis and post-translational processing of different precursors of somatostatin. In: Rich DH, Gross E (Eds) *Peptides: synthesis - structure - function: Proceedings of the Seventh American Symposium*. Rockford III. Pierce Chemical Company: 471 - 9
- Siler TM, Vandenberg G, Yen SSC, Brazeau P, Vale W, Guillemin R (1973) Inhibition of growth hormone release in humans by somatostatin. *J Clin Endocrinol Metab* 37: 632 - 5
- Sims KB, Hoffman DL, Said SI, Zimmerman EA (1980) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in mouse and rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res* 186: 165 - 83
- Sims NR, Bowen DM, Allan SJ, Smith CCT, Neary D, Thomas DJ, Davison AN (1983) Presynaptic cholinergic dysfunctions in patients with dementia. *J Neurochem* 40: 503 - 9
- Skowsky WR, Fisher DA (1972) The use of thyroglobulin to induce antigenicity to small molecules. *J Lab Clin Med* 80: 134 - 44
- Sofroniew MV and Weindl A (1978) Projections from the parvocellular vasopressin and neurophysin-containing neurons of the suprachiasmatic nucleus. *Am J Anat* 153: 391 - 430
- Srikant CB and Patel YC (1981) Somatostatin receptors: identification and characterization in rat brain membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3930 - 4
- Stent GS (1973) A physiological mechanism for Hebb's postulate of learning. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 997
- Sternberger LA (1979) *Immunohistochemistry* (2nd edition). John Wiley and Son, New York
- Sundler F, Alumets J, Hakanson R, Ingemansson S, Fahrenkrug J, Schaffalitzky de Muckadell OB (1977) VIP innervation of the gall-bladder. *Gastroenterology* 72: 1375 - 7
- Sundler F, Alumets J, Hakanson R, Fahrenkrug J, Schaffalitzky de Muckadell OB (1978) Peptidergic (VIP) nerves in the pancreas.

Histochemistry 55: 173 - 6

Tannenbaum GS (1980) Evidence for autoregulation of growth hormone secretion via the central nervous system. *Endocrinology* 107: 2117 - 20

Terry LC, Martin JB (1981) The effects of lateral hypothalamic - medial forebrain stimulation and somatostatin antiserum on pulsatile growth hormone secretion in freely behaving rats: evidence for a dual regulatory mechanism. *Endocrinology* 109: 622 - 7

Thulin L and Olsson P (1973) Effects of intestinal peptide mixture G2 and vasoactive intestinal peptide VIP on splanchnic circulation in the dog. *Acta chir scand* 139: 691 - 7

Triepel J, Elger KH et al. (1984) Somatostatin-like immunoreactive neurons and axons in the central nervous system of guinea pig, tupaia and cat. In: Raptis S, Rosenthal J, Gerich JE (Eds) 2nd International Symposium on Somatostatin. Attempto-Verlag, Tübingen: 487 - 90

Tarell JB, Lasenzi M, Gerich JE, Farsham PM (1975) Inhibition by somatostatin of ACTH secretion in Nelson's syndrome. *J Clin Endocr* 40: 1125

Unger J, Weindl A, Pitzl H, Schrell U, Lange W (1984) Antiserumproduktion gegen Somatostatin (ST): Titerkontrolle mit ELISA und Radioimmunoassay zur Bestimmung der quantitativen Verteilung von ST im Rattengehirn. *Verh Anat Ges* 78: 515 - 7

Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlag E, Ross GT (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J Clin Endocr* 33: 988 - 91

Vale W, Rivier C, Brazeau P, Guillemin R (1974) Effects of somatostatin on the secretion of thyrotropin and prolactin. *Endocrinology* 95: 968

Vale W, Ling N, River J et al (1976) Anatomic and phylogenetic distribution of somatostatin. *Metabolism* 25, Suppl 1: 1491 - 4

Vincent SR, Staines WA, Fibiger HC (1983) Histochemical demonstration of separate populations of somatostatin and cholinergic neurons in the rat striatum. *Neurosci Lett* 35: 111 - 4

Vincent SR, Johansson O, Hökfelt T, Skirboll L, Elde RP, Terenius L, Kimmel J, Goldstein M (1983) NADPH-Diaphorase: A selective

- histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities. *J Comp Neurol* 217: 251 - 63
- Voller A, Bidwell DG, Bartlett A (1979) The Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Dynatech Lab Inc, Flowline Publications, Guernsey, Europe
- Warren TG, Shields D (1982) Cell-free biosynthesis of somatostatin-precursors: evidence for multiple forms of preprosomatostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 3729 - 33
- Weeke J, Hansen AP, Lundaek K (1975) Inhibition by somatostatin of basal levels of serum thyrotropin in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 41: 168 - 71
- Wehrenberg WB, Ling N, Böhlen P, Esch F, Brazeau P, Guillemin R (1982) Physiological roles of somatostatin and somatostatin in the regulation of growth hormone secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 109: 562 - 7
- Weindl A, Sofroniew MV (1980) Immunocytochemical localization of hypothalamic peptide-hormones in neural target areas. In: Wuttke W, Weindl A, Voigt KH, Dries RR (Eds), Brain and pituitary peptides. S. Karger, Basel: 97 - 109
- Weindl A, Sofroniew MV, Wetzstein R (1984) Comparative aspects of the distribution of somatostatin in the mammalian brain and spinal cord. In: Rosenthal J (Ed), Proceedings of the 2nd symposium on somatostatin, Athens 1981, University Press, Tübingen
- Wood WG, Stalla G, Müller OA, Scriba PC (1979) A rapid and specific method for separation of bound and free antigen in radioimmunoassay systems. *J Clin Chem Clin Biochem* 17: 111 - 4
- Wood PL, Etienne P, Lal S, Gauthier S, Nair NPV (1982) Reduced lumbar CSF somatostatin in Alzheimer's disease. *Life Sci* 31: 2037 - 79
- Yamada Y, Ito S, Matsubara Y and Kobayashi S (1977) Immunohistochemical demonstration of somatostatin -containing cells in the human, dog and rat thyroids. *J Exp Med* 122: 87 - 92
- Yamada T, Marshak D, Basinger S, Walsh J, Marley J, Stell W (1980) Somatostatin-like immunoreactivity in the retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1691 - 5

Zingg HH, Patel YC (1982) Biosynthesis of immunoreactive somatostatin by hypothalamic neurons in culture. J Clin Invest 70: 1101 - 9

Anhang

A) Statistik

Die Angabe der Daten aus den quantitativen Untersuchungen im Gewebe und Liquor erfolgen jeweils als Mittelwert $\pm$ SEM (Standard Error of the Mean). Eine Ausnahme gibt es bei der Untersuchung des Parkinsongehirns, da nur ein Präparat vorlag. Zur statistischen Überprüfung der Daten aus den Liquoruntersuchungen hinsichtlich signifikanter oder nicht signifikanter Abweichungen der Werte von Patientenliquores von denen der Kontrollpersonen wurden Varianzanalysen durchgeführt.

B) Verzeichnis wichtiger Chemikalien und deren Bezugsquellen

1. Immunhistochemie

- Carrageenan Type IV, No. C-3889, SIGMA
- 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride, No. D-5637, SIGMA
- Goat-Antirabbit-IgG (whole molecule), No. R-5001, SIGMA
- Rabbit-Peroxidase-Antiperoxidase, eigene Herstellung
- Triton X-100, No. T-6878, SIGMA

2. ELISA

- Antirabbit-IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase-conjugated, No. 104-0, SIGMA
- Diäthanolamin, Art. 803116, MERCK-SCHUCHARDT
- Phosphatase-Substrat, No. 104-0, SIGMA

3. Radioimmunoassay

- Albumin Bovine RIA Grade, No. A-7888, SIGMA
- Carboxymethyl Cellulose CM 52, No. 4037-050, WHATMAN

- Donkey-Antirabbit-Precipitating Serum for Radioimmunoassay,
WELLCOME
- ¹Tyr-Somatostatin, No. S-4633, SIGMA
- Somatostatin-14 (synthetisch), DIAMALT
- Vasoaktives Intestinales Polypeptid, PENINSULA

Die übrigen Peptide, die für Spezifitätskontrollen der Antiseren verwendet wurden, wurden von der Fa. BACHEM Feinchemikalien AG, Bubendorf/Schweiz bezogen.

4. Proteinbestimmung

- Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, Art. 9001, MERCK

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. W. Lange (Anatomische Anstalt der Universität München) für seine geduldige Betreuung, für zahlreiche interessante und fruchtbare Gespräche und für die Korrektur der Arbeit.

In gleichem Maße danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. A. Weindl (Neurologische Klinik der Technischen Universität München) für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Labor, sowie für zahlreiche Anregungen und Diskussionen. Ohne die vielseitige Unterstützung und Förderung durch Prof. W. Lange und Dr. A. Weindl wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Gedankt sei auch den Ärzten und Mitarbeitern der Neurologischen Klinik der TU (Direktor: Prof. Dr. med. A. Struppler) und des Instituts für Rechtsmedizin der LMU (Vorstand: Prof. Dr. med. W. Spann) für die Bereitstellung der Untersuchungsproben. Stellvertretend seien an dieser Stelle Herr Dr. med. H. Gnahn, Herr Dr. med. G. Küther (beide aus der Neurologischen Klinik) und Herr Dr. med. T. Gilg (Institut für Rechtsmedizin) genannt.

Schließlich gilt mein besonderer Dank den technischen Mitarbeitern der Anatomischen Anstalt, insbesondere meinen Mitarbeiterinnen im Labor 13, Frau I. Wild und Fräulein S. Mühlisner, die beide durch hervorragendes technisches Geschick und persönliches Engagement sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Diese Arbeit wurde innerhalb des Projektes "Neuroendokrine Neurone", We 608/7 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt.

Lebenslauf Jürgen Walter Unger

- geboren am 25. 3. 1959 in Lindau/Bodensee;
Eltern: Johann und Josefine Unger
- 1965 Einschulung in die Knabenvolksschule Landshut-Achdorf
(jetzige Karl-Heiß-Volksschule Landshut)
- 1970 Wechsel auf das Hans-Leinberger-Gymnasium Landshut,
mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig
- am 27. 6. 1979 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife am
selben Gymnasium
- ab Wintersemester 1979 Studium der Medizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität München
Ärztliche Vorprüfung am 28. 8. 1981
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 10. 9. 1982
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 7. 9. 1984
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 4. 11. 1985
- am 13. 11. 1985 Approbation als Arzt durch das Bayerische
Staatsministerium des Innern
- ab 1. 12. 1985 vollbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft
an der Anatomischen Anstalt der Universität München,
Lehrstuhl III (Vorstand: Prof. Dr. med. W. Lange)

